

**SANDRA CRESTANI**

**Efeitos do consumo elevado de sal sobre as vias  
renina-angiotensina-aldosterona, RhoA/ROCK e a  
recaptação de cálcio no sistema cardiovascular de  
ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), como pré-requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva  
Santos

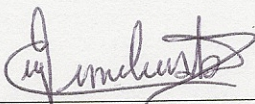
Co-orientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo A.  
Marques  
Prof. Dr. R. Clinton Webb

**Curitiba  
2012**

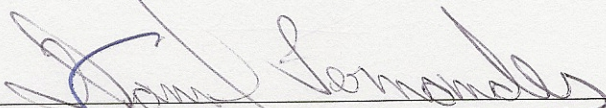


## PARECER

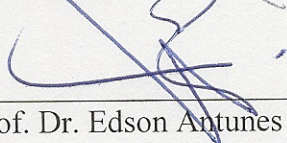
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “EFEITOS DO CONSUMO ELEVADO DE SAL SOBRE AS VIAS RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA, RhoA/ROCK E A RECAPTAÇÃO DE CÁLCIO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS”, de autoria da pós-graduanda **SANDRA CRESTANI**, sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e banca composta pelos professores: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente - Farmacologia - UFSC), Prof. Dr. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas – UEPG), Prof. Dr. Edson Antunes (Farmacologia – UNICAMP), Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas – UEPG) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yanna Dantas Rattmann (Saúde Comunitária – UFPR), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 31 de outubro de 2012.



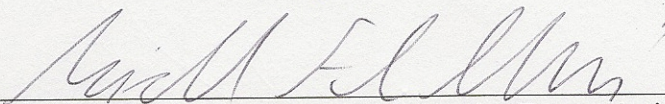
Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente - Farmacologia - UFSC)



Prof. Dr. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas – UEPG)



Prof. Dr. Edson Antunes (Farmacologia – UNICAMP)



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas – UEPG)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yanna Dantas Rattmann (Saúde Comunitária – UFPR)

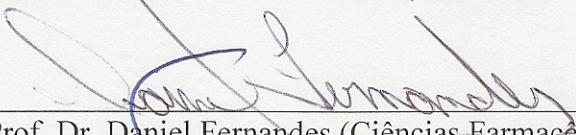


**ATA DO JULGAMENTO DA 16ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

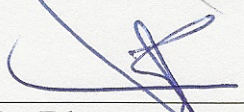
Ao trigésimo primeiro dia do mês de outubro do ano de dois mil e doze, às quatorze horas, no Anfiteatro nº10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria da pós-graduanda **SANDRA CRESTANI** intitulada: “EFEITOS DO CONSUMO ELEVADO DE SAL SOBRE AS VIAS RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA, RhoA/ROCK E A RECAPTAÇÃO DE CÁLCIO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS”, sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e banca composta pelos professores: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente - Farmacologia - UFSC), Prof. Dr. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas – UEPG), Prof. Dr. Edson Antunes (Farmacologia – UNICAMP), Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas – UEPG) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yanna Dantas Rattmann (Saúde Comunitária – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos e a candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADO. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais membros da banca examinadora, em Curitiba, 31 de outubro de 2012.



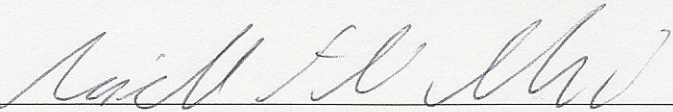
Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente - Farmacologia - UFSC)



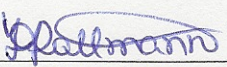
Prof. Dr. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas – UEPG)



Prof. Dr. Edson Antunes (Farmacologia – UNICAMP)



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas – UEPG)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yanna Dantas Rattmann (Saúde Comunitária – UFPR)



Ao meu marido Danilo pelo carinho, apoio, incentivo, amor e compreensão. Mesmo sem entender algumas coisas você sempre esteve comigo. Obrigada por compreender que minha ida aos Estados Unidos era importante para minha formação e ter me apoiado nessa também.

À minha melhor amiga e irmã (Silvânia), por seu amor, desprendimento, doação e companheirismo. Pelo apoio durante todas as etapas de minha vida. Se eu tivesse que escolher alguém para ser minha irmã certamente seria você. Meu cunhado (Paulo) por ter me apoiado sempre. Deus não me deu um irmão de sangue, mas me deu um irmão de coração que é você. Meu amado sobrinho (Luiz Paulo) meu companheiro de todas as horas. Obrigada por perceber os meus maus momentos, sem que eu dissesse uma só palavra e simplesmente se fazer presente.

Aos meus pais (Luiz Valmir e Ione), pelo carinho, incentivo, amor e dedicação em todos os momentos de minha vida. A educação que vocês me deram, tanto intelectual quanto espiritual, permitiu que eu pudesse traçar meu caminho. Sem vocês eu não seria quem sou.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me dado força e coragem para nunca desistir, por ter iluminado meus pensamentos para que eu sempre tomasse a melhor decisão e por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas que me ajudaram de muitas formas no desenvolvimento desse trabalho.

À professora Dra. Maria Consuelo Andrade Marques, minha co-orientadora, por ter me dado suporte que foi além dos ensinamentos científicos, pela dedicação e paciência que sempre teve para comigo. Por ter lutado por várias coisas, principalmente recursos que foram fundamentais para que outras oportunidades surgissem. Você é a grande culpada por eu ter ficado na farmacologia em um momento em que as coisas estavam um tanto confusas.

Ao professor Dr. José Eduardo da Silva Santos, meu orientador, pelas valiosas sugestões e correções, pelo apoio, paciência e confiança. Por ter possibilitado o contato com o Dr. Webb e confiado no nosso trabalho a ponto de permitir meu estágio no Georgia Health Sciences University

Ao professor Dr. R. Clinton Webb por me permitir ser parte do seu laboratório e me proporcionar momentos importantes em minha carreira. A liberdade de criação que você proporciona aos alunos é incrível.

Às minhas colegas de laboratório, Priscila e Rita, por terem me apoiado em todos os momentos, além de minhas irmãs científicas, vocês se tornaram minhas amigas e isso foi fundamental durante esses anos.

Aos meus colegas do Webb`s lab, Hicham, Heihun, Kate, Stella, Inger, Jason e Trevor. Foi muito bom conviver com culturas diferentes e com pessoas especiais, cada um a sua maneira me ensinou alguma coisa. A convivência ficará registrada para sempre em minha memória.

Aos meus amigos brasileiros de Augusta (USA), Kenia, Fernanda, Vitor, Gisele, Wagner e Anne por terem me acolhido de forma tão calorosa. Vocês foram minha família enquanto estive aí, estarão para sempre em meu coração.

A romena mais brasileira que já conheci, Theodora Szasz, por fazer parte da minha família nos Estados Unidos.

A Sayuri e Kenzo por terem abdicado da privacidade familiar e me acolhido tantas e tantas vezes em sua casa, vocês fizeram eu me sentir em casa também.

Ao professor Jamil Assreuy por abrir as portas do seu laboratório e permitir a realização de alguns experimentos.

A Adriane Madeira, Paulo e Taísa por me receberem em vossa casa de forma tão gentil e acolhedora.

A Karla Guarido (Kaka) que aceitou me receber em sua casa antes mesmo de nos conhecermos e me permitiu sua valorosa amizade.

Ao Arquimedes Gasparotto Junior pelas valorosas colaborações estabelecidas durante todo o período do meu doutorado.

A Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia por todo o suporte concedido durante esse trabalho.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia da Georgia Health Sciences University, por me permitir fazer parte de um lugar onde se privilegia a pesquisa, o que certamente contribuiu para o meu crescimento e formação profissional.

A todos os professores de Farmacologia da UFPR, pelos conhecimentos transmitidos, esforço e exemplos de competência.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR e do biotério por todo suporte necessário à execução deste trabalho. Agradeço especialmente à Silvia, Eirich, Linda, Seu Jorge, Eli, Patricia, Aline, Dani, Nair, Luiz, Cândido, Diego e Isabel.

Aos colaboradores do Georgia Health Sciences University, Shali Zhang, Cathy Davidson, Bobbie Willcox e Beverly Tarver, pelo suporte durante o meu estágio.

A Nuvital Nutrientes SA, em especial ao Sr. Alaor pela doação do farelo para a fabricação da ração high salt nos primeiros meses desse trabalho.

Aos animais, minha gratidão e respeito.

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver.  
[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito,  
não sou o que deveria ser, não sei o que irei ser,  
mas, graças a Deus, não sou o que eu era.[...]"*

Martin Luther King



## SUMÁRIO

	Lista de tabelas.....	i
	Lista de abreviaturas.....	ii
	Lista de figuras.....	v
	Resumo.....	vii
	Abstract.....	x
<b>I</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	Doenças cardiovasculares.....	1
1.2	Principais mecanismos de controle da pressão arterial.....	5
1.2.1	Controle do tônus vascular.....	8
1.2.2	Participação do sistema renal na manutenção da pressão arterial.....	10
1.2.3	Envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) na homeostasia dos níveis pressóricos.....	12
1.2.4	Via Rho quinase e sistema vascular.....	14
1.2.5	A participação dos canais de cálcio no controle da pressão arterial.....	16
1.3	Dieta rica em sal x hipertensão.....	18
<b>II</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	22
<b>III</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivo específico.....	23
<b>IV</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
4.1	Drogas.....	25
4.2	Animais.....	26
4.3	Registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados.....	26
4.4	Registro indireto da pressão arterial sistólica em ratos acordados.....	27
4.5	Avaliação da diurese dos animais <i>high-salt</i> .....	27
4.6	Registro das alterações vasculares de aorta e pequenas artérias mesentéricas isoladas de rato.....	28
4.7	Dosagens e ensaios.....	29
4.7.1	Determinação de nitrato/nitrito sérico (NOx).....	29
4.7.2	Avaliação dos níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona.....	29
4.7.3	Ensaio para quantificação da atividade da ECA.....	30
4.7.4	<i>Western blot</i> .....	31

4.7.5	Separação das organelas celulares para ensaio de <i>Western blot</i> .....	31
4.8	Mensuração da liberação de cálcio intracelular em células isoladas de aorta de ratos expostos a dieta <i>high salt</i> .....	32
4.9	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS <i>in vivo</i> E <i>in vitro</i> .....	33
4.9.1	Avaliação da pressão arterial sistólica.....	33
4.9.2	Avaliação da diurese dos animais <i>high-salt</i> .....	33
4.9.3	Investigação da responsividade vascular de animais <i>high-salt</i> a agentes vasoconstritores e vasodilatadores <i>in vivo</i> .....	34
4.9.4	Relaxamento induzido por acetilcolina e nitroprussiato de sódio.....	34
4.9.5	Resposta constritora produzida por fenilefrina, angiotensina I e angiotensina II <i>in vitro</i> .....	35
4.9.6	Avaliação do efeito da inibição da via RhoA/ROCK em anéis de aorta e pequenas artérias mesentéricas de animais <i>high-salt</i> .....	35
4.9.7	Avaliação dos efeitos da dieta <i>high salt</i> no influxo de cálcio.....	35
4.9.8	Investigação dos efeitos da dieta <i>high salt</i> na mobilização de cálcio intracelular.....	36
4.10	Análise dos resultados e testes estatísticos.....	36
V	<b>RESULTADOS</b> .....	37
5.1	Ausência de efeito da dieta com altas concentrações de cloreto de sódio na pressão arterial de ratos anestesiados e acordados.....	37
5.2	Responsividade à acetilcolina e nitroprussiato de sódio, <i>in vivo</i> , induzida por dieta hipersódica.....	38
5.3	Ratos expostos à dieta <i>high salt</i> tem redução de nitrito/nitrato sérico (NOx).....	41
5.4	Responsividade das artérias aorta e mesentérica à ACh e ao nitroprussiato de sódio.....	41
5.5	Aumento da responsividade à angiotensina I e II em ratos expostos à dieta <i>high salt</i> .....	43
5.6	Efeito <i>in vitro</i> da angiotensina I e II em artérias aorta isoladas de ratos.	46
5.7	Ratos expostos a dieta <i>high salt</i> 8% tem maior atividade da ECA plasmática.....	47
5.8	Aumento da expressão dos receptores AT1 AT2 de angiotensina II.....	49
5.9	Redução nos níveis de angiotensina II e aldosterona no plasma de	49

	ratos expostos a dieta <i>high salt</i> .....	
5.10	Efeito natriurético aumentado em ratos expostos à dieta <i>high salt</i> .....	50
5.11	Níveis de eletrólitos no plasma de ratos expostos à dieta <i>high salt</i> .....	52
5.12	Responsividade à fenilefrina <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	53
5.13	Responsividade de artérias de condutância e resistência ao inibidor da ROCK.....	55
5.14	Efeito do composto Y-27632 na contração induzida pela fenilefrina.....	56
5.15	Efeito da dieta hipersódica na expressão de proteínas da via RhoA/ROCK.....	59
5.16	Efeito da dieta <i>high salt</i> no influxo de cálcio em preparações vasculares.....	62
5.17	Efeito da dieta hipersódica sobre a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em preparações vasculares.....	62
5.18	Dieta <i>high salt</i> reduz a liberação e recaptção de cálcio intracelular em células musculares lisas de aorta.....	65
5.19	Redução da expressão de SERCA em aortas de ratos <i>high salt</i> .....	66
5.20	A expressão de calmodulina foi aumentada em aorta de ratos expostos à dieta com NaCl 4%.....	69
5.21	Aumento da expressão da cadeia leve de miosina (MLC) em aorta de ratos expostos à dieta NaCl 4%.....	70
VI	<b>DISCUSSÃO</b> .....	72
VII	<b>CONCLUSÕES</b> .....	88
VIII	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	89
IX	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Principais causas de óbito no Brasil no ano de 2009	2
<b>Tabela 2</b>	Projeção para as principais causas de óbito no mundo em 2030	2
<b>Tabela 3</b>	Pressão arterial e frequência cardíaca de ratos anestesiados previamente expostos à dieta <i>high salt</i> ou padrão	37

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACh	Acetilcolina
ADH	Hormônio antidiurético
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina 3', 5'
ANOVA	Análise de variância
AT1	Receptor do tipo 1 para angiotensina II
AT1 <sub>A</sub>	Receptores para angiotensina II tipo 1 subtipo A
AT1 <sub>B</sub>	Receptores para angiotensina II tipo 1 subtipo B
AT2	Receptor para angiotensina II do tipo 2
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
BK <sub>Ca</sub>	Canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância
BSA	Albumina bovina sérica
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CAMKII	Quinase dependente da Ca <sup>2+</sup> /calmodulina tipo II
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
DCV	Doenças cardiovasculares
DNC	Doenças não comunicáveis
DNCT	Doenças crônicas não transmissíveis
DTT	DL-ditiotreitol
E <sup>+</sup>	Presença de endotélio
E <sup>-</sup>	Ausência de endotélio
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol tretra-acético
ET-1	Endotelina 1
ET-2	Endotelina 2
ET-3	Endotelina 3

Fura 2-AM	Fura 2-acetoximetil Ester
GC-A	Guanilato ciclase A
GMPc	Monofosfato cíclico Guanosina 3', 5'
GEF	Fator de troca de nucleotídeo guanina
HCl	Ácido clorídrico
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato de inositol
i.v.	Intravenoso
JNC	<i>Joint National Committee</i>
K <sup>+</sup>	Potássio
KCl	Cloreto de cálcio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrogenofosfato de potássio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
mmHg	Milímetros de mercúrio
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLC	Cadeia leve de miosina
pMLC	Cadeia leve de miosina fosforilada
mM	Milimolar
mN	MiliNewton
MYPT1	Subunidade 1 da miosina fosfatase
pMYPT1	Subunidade 1 da miosina fosfatase fosforilada
mmol	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotida fosfato
Na <sup>+</sup>	Sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média



PAS	Pressão arterial sistólica
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PMSF	Fluoreto fenilmetanesulfonil
pM	Pico molar
PNA	Peptídeo natriurético atrial
PSS	Solução salina fisiológica
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
ROCK	Rho quinase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBC	Sociedade Brasileira de cardiologia
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERCA	Ca <sup>+2</sup> ATPase no retículo sarcoplasmático
SERCA2	Ca <sup>+2</sup> ATPase tipo 2 no retículo sarcoplasmático
SERCA3	Ca <sup>+2</sup> ATPase tipo 3 no retículo sarcoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
STIM1	Moléculas de interação estromal 1
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina
T-per	Reagente de extração de proteína do tecido
μM	MicroMolar
μl	Microlitro
%	Porcentagem
°C	Graus célsius

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Causas de mortalidade no mundo em 2008	1
<b>Figura 2</b>	Avaliação semanal da pressão arterial sistólica em animais acordados	38
<b>Figura 3</b>	Redução do efeito da acetilcolina na pressão arterial média de ratos <i>high salt</i> anestesiados	39
<b>Figura 4</b>	Ausência de alterações no efeito hipotensor do nitroprussiato de sódio em ratos anestesiados submetidos à dieta <i>high salt</i>	40
<b>Figura 5</b>	Redução de NOx sérico em animais expostos a dieta NaCl 8%	41
<b>Figura 6</b>	Relaxamento induzido pela administração cumulativa de acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em anéis de artérias aorta ou pequenas artérias mesentéricas	42
<b>Figura 7</b>	Aumento dos efeitos hipertensivos da angiotensina I em ratos normotensos jovens, expostos à dieta <i>high salt</i>	44
<b>Figura 8</b>	Aumento da resposta pressórica induzida pela angiotensina II em ratos normotensos jovens expostos à dieta <i>high salt</i>	45
<b>Figura 9</b>	Contração induzida pela adição cumulativa de angiotensina I em artérias aorta	46
<b>Figura 10</b>	Efeito da adição cumulativa de angiotensina II artérias aortas isoladas	47
<b>Figura 11</b>	Aumento da atividade da ECA plasmática e redução do efeito hipotensor da bradicinina em ratos normotensos jovens expostos à dieta <i>high salt</i>	48
<b>Figura 12</b>	Alteração da expressão dos receptores AT1 e AT2 para angiotensina II em aorta de ratos tratados com dieta <i>high salt</i>	49
<b>Figura 13</b>	Redução dos níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona em ratos normotensos jovens expostos à dieta <i>high salt</i>	50
<b>Figura 14</b>	Aumento da diurese e natriurese e redução da excreção de potássio em ratos normotensos jovens submetidos à dieta <i>high salt</i>	51
<b>Figura 15</b>	Ausência de efeito da dieta <i>high salt</i> na densidade e pH da urina acumulada	52

<b>Figura 16</b>	Níveis de eletrólitos no plasma de ratos expostos à dieta <i>high salt</i>	53
<b>Figura 17</b>	Aumento da resposta pressórica induzida pela fenilefrina em ratos normotensos jovens expostos à dieta <i>high salt</i>	54
<b>Figura 18</b>	Contração induzida pela adição cumulativa de fenilefrina em artérias aorta e mesentéricas	55
<b>Figura 19</b>	Relaxamento induzido pelo inibidor da ROCK em anéis de artérias aorta e mesentéricas de resistência	56
<b>Figura 20</b>	Efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta com endotélio	57
<b>Figura 21</b>	Efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio	58
<b>Figura 22</b>	Efeito do composto Y-27632 em anéis de artéria mesentéricas contraídos pela fenilefrina	59
<b>Figura 23</b>	Expressão de RhoA, RhoE, ROCKI e ROCKII em aorta de ratos	60
<b>Figura 24</b>	Aumento da expressão de RhoA na membrana na aorta de ratos tratados com dieta <i>high salt</i>	61
<b>Figura 25</b>	Aumento da fosforilação de em anéis de aorta de ratos tratados com dieta <i>high salt</i>	61
<b>Figura 26</b>	Efeito da dieta <i>high salt</i> no influxo de cálcio	62
<b>Figura 27</b>	Efeito da dieta <i>high salt</i> na liberação de cálcio intracelular do retículo sarcoplasmático de artérias aorta	63
<b>Figura 28</b>	Efeito da dieta <i>high salt</i> na liberação de cálcio intracelular do retículo sarcoplasmático de artérias mesentéricas	64
<b>Figura 29</b>	Aumento da contração induzida por CaCl <sub>2</sub> em meio livre de cálcio	64
<b>Figura 30</b>	Redução da liberação de cálcio intracelular em células musculares lisas de aorta	66
<b>Figura 31</b>	Expressão dos receptores IP <sub>3</sub> e rianodina na aorta de ratos expostos à dieta <i>high salt</i>	67
<b>Figura 32</b>	Expressão de proteínas regulatórias do influxo de cálcio em aorta de ratos <i>high salt</i>	68
<b>Figura 33</b>	Redução da expressão da SERCA2 e SERCA3 em aortas de ratos <i>high salt</i>	69
<b>Figura 34</b>	Aumento da expressão de calmodulina e da CAMKII em aorta de	70



ratos tratados com dieta *high salt*

- Figura 35** Aumento da expressão de cadeia leve de miosina, mas não da sua forma fosforilada em aorta de ratos expostos a dieta NaCl 4% 71
- Figura 36** Principais alterações funcionais e moleculares induzidas por dieta *high salt* em vasos 86

## RESUMO

Quantidades elevadas de sal estão presentes na dieta de boa parte da população, desde as fases iniciais de vida e esse hábito tem sido associado com distúrbios cardiovasculares, principalmente hipertensão. A via RhoA/Rho-quinase tem sido associada com a hipertensão, mas seu papel nas alterações cardiovasculares induzidas por uma sustentada exposição ao excesso de sal ainda não está totalmente esclarecida. O objetivo do presente estudo foi investigar a responsividade e funcionalidade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), RhoA/Rho-quinase e mobilização de cálcio em ratos expostos à dieta com excesso de cloreto de sódio (*high salt*) desde o desmame. Para isso, ratos machos *Wistar* com 21 dias de idade receberam ração contendo 0,27% (controle), 2, 4 ou 8% de cloreto de sódio durante 6 semanas. A pressão arterial média (PAM), mensurada em ratos anestesiados ao final do tratamento se manteve inalterada, assim como a pressão arterial sistólica (PAS) avaliada semanalmente a partir da segunda semana de tratamento em ratos conscientes também foi semelhante em todos os grupos. A ação hipotensora da acetilcolina foi reduzida em ratos expostos à dieta NaCl 4 e 8%, mas a resposta à nitroprussiato de sódio não foi alterada. Os grupos que receberam dieta *high salt* 4 e 8% tiveram aumento da responsividade para angiotensina I e II e esta resposta foi acompanhada pelo aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e pela redução do tempo de resposta hipotensora induzida pela bradicinina nos ratos pertencentes ao grupo NaCl 8%. Não obstante, os níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona foram significativamente reduzidos nos animais submetidos a dieta NaCl 4 e 8%, um resultado acompanhado pelo aumento da diurese e excreção renal de sódio. Também observamos que os níveis de eletrólitos (sódio, cálcio e potássio) no plasma dos animais expostos à dieta *high salt* não foram alterados. Além disso, a expressão de receptores para angiotensina II tipo 1 (AT1) foi aumentada, enquanto a expressão de receptores para angiotensina II tipo 2 foi reduzida em aorta de ratos do grupo NaCl 4%. A dieta *high salt* não modificou o relaxamento induzido por acetilcolina e Y-27632 em artérias aorta e mesentéricas de resistência isoladas. A préincubação do composto Y-27632 reduziu a contração máxima induzida pela fenilefrina em artérias de ratos

controle. Entretanto foram necessárias altas concentrações para obter o mesmo efeito em artérias oriundas de ratos submetidos à dieta *high salt*. Nesse ínterim, observamos que aorta de animais pertencentes ao grupo NaCl 4% tiveram aumento da translocação da RhoA do citosol para a membrana plasmática, além de considerável aumento da expressão da subunidade 1 da miosina fosfatase fosforilada (pMYPT1). A contração induzida por cloreto de cálcio em meio despolarizante permaneceu inalterada, assim como a expressão da STIM1, Orai1 e fosfolambam em aorta. Por outro lado, a contração causada pela cafeína e fenilefrina (em solução livre de cálcio) foi significativamente reduzida em vasos de ratos tratados com dieta *high salt*. Além disso, o cálcio no repouso e sob estímulo com ATP foi reduzido em células musculares lisas isoladas de aorta de ratos submetidos à dieta *high salt*, assim como a liberação de cálcio depois da recaptação pelo retículo sarcoplasmático. Corroborando esses dados, a expressão de SERCA2 e SERCA3 foi menor em aortas de ratos do grupo *high salt* quando comparadas ao grupo controle. Outrossim, a dieta com cloreto de sódio aumentou a expressão de calmodulina, proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CAMKII) e cadeia leve de miosina, mas reduziu a expressão da quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) sem alterar a fosforilação da cadeia leve de miosina. Nossos resultados demonstraram que ratos normotensos expostos à altas concentrações de cloreto de sódio desde o desmame até se tornarem adultos jovens tem redução dos níveis circulantes de angiotensina II e aldosterona. Entretanto houve maior responsividade vascular para a angiotensina II, uma condição associada pelo menos em parte, com o aumento da expressão de receptores AT1. Além disso, nossos dados nos sugerem que uma longa exposição à dieta *high salt* aumenta a atividade da RhoA e reduz a recaptação de cálcio para dentro do retículo endoplasmático, revelando o envolvimento dessas vias nos efeitos deletérios no sistema cardiovascular causados pela ingestão excessiva de sal.

## ABSTRACT

Elevated amounts of sodium are frequently present in the human diet from a very early age, albeit its excessive consumption has been putatively correlated with cardiovascular disturbances, mainly hypertension. The RhoA/Rho-kinase pathway has been associated with hypertension, but its role in the vascular changes induced by sustained high-salt exposition was scarcely investigated. The aim of this study was to investigate the responsiveness and endogenous functionality of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), RhoA/Rho-kinase and calcium pathway in rats exposed to high sodium diet starting from weaning. For this, groups of male Wistar rats (21 days old) received chow containing 0.27 (control), 2, 4, or 8% NaCl for 6 weeks. Although, exposition to high sodium diet did not increase arterial pressure, in either, anesthetized and conscious rats. The hypotensive effect of acetylcholine, but not of sodium nitroprusside, was reduced in rats exposed to 4 and 8% NaCl. The hypertensive effects of angiotensin I and II were increased in rats from 4 and 8% NaCl groups, which was accompanied by increased activity of the plasmatic angiotensin-converting enzyme and reduced hypotensive effects of bradykinin in 8% NaCl group. Nevertheless, plasmatic levels of both angiotensin II and aldosterone were strongly reduced in 4 and 8% NaCl groups, a situation accompanied by increased diuresis and renal excretion of sodium. Furthermore, levels of electrolytes (sodium, calcium and potassium) in plasma were not change. In addition, the expression levels of AT1 angiotensin II receptors were increased, while AT2 receptors were reduced in the aorta of 4% NaCl group. The high-salt intake did not change the relaxation induced by acetylcholine and Y-27632 in aorta or small mesenteric arteries. Preincubation of Y-27632 reduced the maximal contraction elicited by phenylephrine in control rings, but was higher concentration was required to obtained same effect in high-salt groups. In addition, high salt intake increased RhoA translocation to plasmatic membrane, and p-MYPT1 expression in aorta. The contraction elicited by calcium chloride in depolarizing solution remained unchanged as well as STIM1, Orai1 and phospholamban expression in aorta. Caffeine and phenylephrine-induced contraction (in calcium free solution) was

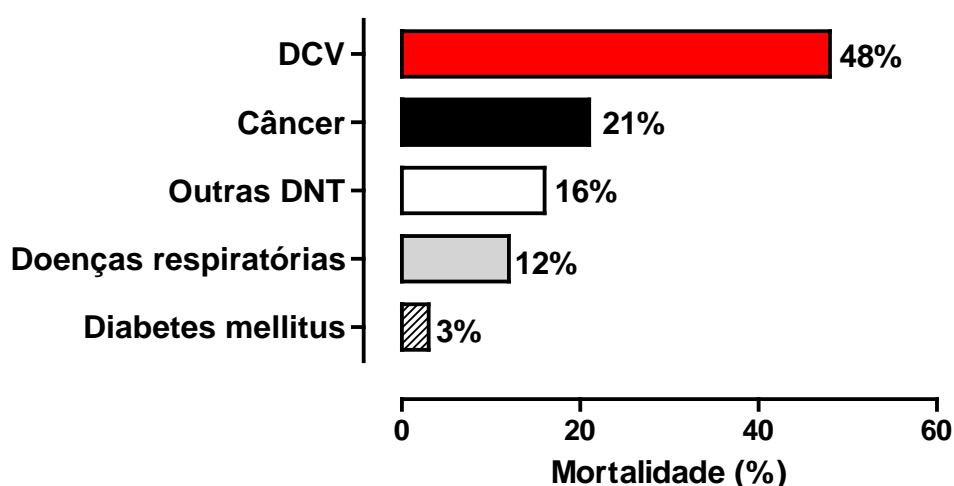
significantly reduced in vessels from high-salt treated rats. Moreover, calcium rest and under ATP stimulus release were reduced in smooth muscle cells from aorta of high salt rats, as well as calcium released after reuptake. In addition, SERCA2 and SERCA3 expression were lower in aorta from high salt rats than control. Besides, high salt intake increased expression of calmodulina, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and myosin light chain but reduced myosin light chain kinase in aorta, without change phospho-myosin light chain expression. Our results show that exposure of normotensive rats to high sodium amounts in early life stages reduces the circulating levels of angiotensin II and aldosterone, but renders the vascular system more sensitive to angiotensin II, a condition associated, at least in part, with an increased expression of AT1 angiotensin II receptors. In addition these data suggest that long-term exposition to high-salt amounts increased RhoA activity and reduced intracellular calcium reuptake in the regulation of agonist-induced vascular contraction, disclosing the involvement of these pathway in the deleterious effects elicited by excessive ingestion of sodium on the cardiovascular system

## I - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de morte, morbidade (WHO 2011) e acompanhamento médico a pacientes no mundo (YUSUF *et al.* 2001). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO 2011), dentre as mortes cujas causas foram registradas, em 2008 as DCV foram responsáveis por aproximadamente 17,3 milhões de mortes (48%), sendo que destes 7,3 milhões foram por doença cardíaca isquêmica e 6,2 milhões por acidente vascular cerebral (AVC). São seguidas por doenças como câncer (21%), outras doenças não transmissíveis e não comunicáveis (21%), doenças respiratórias (12%) e diabetes *mellitus* (3%) (Figura 1).

Dados do Ministério da Saúde revelam que no Brasil, em 2009, dentre as doenças crônicas não transmissíveis, as DCV também foram responsáveis pelo maior número de casos de morte, o qual correspondeu a 28,6% do total de óbitos ocorridos registrados (Tabela 1). Na sequência aparecem as neoplasias (15,1%), doenças do aparelho respiratório (5,4%), diabetes *mellitus* (4,6%), outras doenças crônicas (12,9%), doenças maternas, infantis e transmissíveis (12,4%) e causas externas (12,2%) (DUNCAN 2010).



**Figura 1: Causas de mortalidade no mundo em 2008.** Figura elaborada com dados extraídos de Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control (WHO 2011). DCV = Doenças cardiovasculares que compreendem doença cardíaca isquêmica e doenças cerebrovasculares. DNT = doenças não transmissíveis. Os dados apresentados são referentes ao total de mortes registradas em 2008.



Apesar dos inúmeros avanços terapêuticos e/ou cirúrgicos para o tratamento das DCV, as perspectivas não são nada animadoras. De acordo com uma projeção realizada em 2006, em 2030 as DCV continuarão sendo responsáveis pelo maior número de mortes em todo o mundo (Tabela 2) (MATHERS e LONCAR 2006).

**Tabela 1: Principais causas de óbito no Brasil no ano de 2009.**

Ordem	Causa	Número de óbitos	%
1	Doenças cardiovasculares	319066	28,6
2	Neoplasias	168562	15,1
3	Doenças respiratórias	59721	5,4
4	Diabetes <i>mellitus</i>	51828	4,6
5	Outras doenças crônicas	143602	12,9
6	Maternas, infantis e transmissíveis	138199	12,4
7	Causas externas	135919	12,2

Fonte: Adaptado de DUNCAN *et al.*, 2010

**Tabela 2: Projeção para as principais causas de óbito no mundo em 2030.**

Ordem em 2030	Causa	% em relação ao total de óbitos
1	Doenças cardíacas isquêmicas	13,4
2	Acidente vascular cerebral	10,6
3	HIV/AIDS	8,9
4	Doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC)	7,8
5	Infecções do trato respiratório inferior	3,5
6	Câncer de traqueia, brônquios e pulmões.	3,1
7	Diabetes <i>mellitus</i>	3,0

Fonte: Adaptado de MATHERS e LONCAR (2006).

Um dos principais fatores de risco para as desordens cardiovasculares é a pressão sanguínea elevada (CARRETERO e OPARIL 2000). A hipertensão é uma das doenças crônicas mais comuns em humanos (LAWES *et al.* 2008). De acordo

com a Organização Mundial da Saúde, em seu relatório de estatísticas de saúde, a hipertensão atinge um em cada três adultos da população mundial. No Brasil a hipertensão acomete 25% da população, chegando a mais de 50% na terceira idade e, surpreendentemente, a 5% dos 70 milhões de crianças e adolescentes brasileiros, segundo dados da Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBC/SBH 2010)

Acredita-se que a hipertensão esteja relacionada com 62% dos AVCs e 42% das doenças isquêmicas do coração (BRUNDTLAND 2002). Vale ressaltar que a maioria ocorreu em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos (WILLIAMS 2009). As perspectivas continuam sendo preocupantes. A previsão para 2025 é que cerca de 30% da população mundial tenha hipertensão (KEARNEY *et al.* 2005). No âmbito nacional, a Sociedade Brasileira de Hipertensão sugere que cerca de dois terços das mortes por DCV tem relação direta com o aumento sustentado da pressão arterial (SBC/SBH 2010). Além disso, de acordo com as VI diretrizes brasileiras de Hipertensão, as DCV contribuem de forma expressiva para o alto índice de internações, gerando custos médicos e socioeconômicos elevadíssimos (SBC/SBH 2010).

Apesar da importância econômica e social da hipertensão e dos muitos esforços da comunidade científica em buscar novos tratamentos, a etiologia da doença não pode ser determinada em cerca de 90 a 95% dos casos (KU 2006) e por isso considerada de origem multifatorial (JACOB 1999), envolvendo predisposição genética e fatores ambientais (fisiológicos e psicológicos), como dieta, atividade física, obesidade e fumo (CRACKOWER *et al.* 2002; KAKAR e LIP 2006). A ideia mais aceita é que a hipertensão é causada por uma interação entre fatores gênicos, múltiplos fatores pressores patogênicos e desordens de fatores depressores fisiológicos (KU 2006).

Levando em consideração todos os aspectos mencionados, o tratamento para a hipertensão é algo mais complexo do que o uso contínuo de fármacos e se faz necessário para garantir a sobrevivência do paciente (MAR e RODRIGUEZ-ARTALEJO 2001). Assim, os anti-hipertensivos, juntamente com a mudança de hábitos, devem não só reduzir a pressão arterial, mas também os eventos cardiovasculares fatais e não fatais. O controle dos níveis pressóricos é tão

importante que uma simples redução de 5 mm Hg na pressão arterial diastólica pode reduzir os riscos de AVCs em 34% e de doenças isquêmicas do coração em 21% (LAW *et al.* 2003). Atualmente os anti-hipertensivos disponíveis para uso clínico são os diuréticos, beta-bloqueadores, vasodilatadores diretos, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores de receptores AT1 da angiotensina II e inibidores diretos da renina. Entretanto, segundo as VI Diretrizes brasileiras de hipertensão (SBC/SBH 2010), o ideal é fazer a individualização da droga, ou seja, um tratamento de acordo com as características de cada paciente. Contudo, como a etiologia da hipertensão normalmente não pode ser determinada na maioria dos indivíduos há a dificuldade para propor uma terapia adequada a cada paciente. Consequentemente, a escolha da terapia acaba sendo tipicamente empírica, baseada em categorias epidemiológicas como idade, raça, presença de outras doenças como diabetes ou problemas cardíacos (COFFMAN 2011). Sendo assim, a Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH) na VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC/SBH 2010), recomenda que o tratamento farmacológico se inicie com a monoterapia, porém o mais utilizado é a associação de fármacos com mecanismos de ação diferentes, para se obter um melhor resultado.

Independente da alta prevalência o fato é que o controle da pressão arterial tem sido insatisfatório no mundo todo, mesmo em pacientes que fazem tratamento e as razões para tal problema são complexas. Entretanto, as persistentes lacunas acerca da compreensão da causa da hipertensão associados a um pequeno repertório de anti-hipertensivos, principalmente drogas que agem em diferentes alvos de uma mesma via, contribuem para o fracasso dos resultados clínicos (COFFMAN 2011). Neste contexto, o investimento em novos estudos que visem investigar alterações e/ou fatores que possam estar corroborando o surgimento de doenças cardiovasculares e hipertensão torna-se tão importante quanto à busca por novas terapias. A identificação de disfunções fisiológicas ocorridas neste sistema pode contribuir significativamente para a prevenção de tais patologias e principalmente para a descoberta de novos alvos terapêuticos.

## 1.2 - Principais mecanismos de controle da pressão arterial

A pressão arterial é definida como a força que o sangue bombeado pelo coração exerce contra as paredes dos vasos (GUYTON 1991). O fluxo sanguíneo depende dos batimentos cardíacos e volume, onde a resistência é primariamente determinada pelo estado de contratilidade das pequenas artérias e arteríolas distribuídas por toda área corporal (COFFMAN 2011). De modo geral, a pressão sanguínea em humanos varia constantemente, porém em repouso, raramente desvia do normal mais do que 10 a 15% durante o dia. Em um adulto normotenso a pressão arterial média (PAM) se mantém entre 120 e 80 mmHg, geralmente próximo a 100 mmHg. Entretanto ela pode ser elevada a mais de 160 mmHg em indivíduos com hipertensão ou até mesmo chegar a 0 nas pessoas que se encontram em situações que comprometem a circulação sanguínea normal (hemorragias) (GUYTON 1991). Porém, o organismo possui mecanismos de controle da pressão arterial que, normalmente, conseguem promover uma resposta adequada frente às ocasiões que a alteram. Esses fatores que controlam a pressão arterial podem sofrer uma série de influências regulatórias, por isso identificar a origem da hipertensão requer a compreensão de uma série de sistemas que contribuem para a homeostasia dos níveis pressóricos (COFFMAN 2011). Apesar de constituírem sistemas metabólicos extremamente variados os mecanismos de controle da pressão arterial atuam de forma integrada para garantir a perfusão adequada a todos os tecidos (LIFTON *et al.* 2001).

Segundo Guyton os mecanismos de controle da pressão sanguínea podem ser classificados de acordo com o tempo necessário para produzir uma ação. Uma resposta rápida (podendo reagir em segundos) é feita pelos barorreceptores, quimiorreceptores e o sistema nervoso central. O controle dos níveis pressóricos que ocorre em horas ou dias (longo prazo) é feito pelos rins. O controle em médio prazo (que ocorre em minutos) é feito por sistemas hormonais como renina-angiotensina, vasopressina, caliceína-cinina, fator natriurético atrial e autacóides derivados do endotélio (GUYTON 1991).

Os barorreceptores estão situados nas paredes das artérias, no seio carotídeo e arco aórtico. Estes são receptores de extensão que respondem alterações estruturais nas paredes dos vasos (distensão ou constrição). Consistem na primeira linha de defesa à hipertensão ou hipotensão aguda

(GUYTON 1991) e ajustam tanto o tônus vagal quanto o sistema nervoso simpático. Os barorreceptores respondem à taxa de aumento de pressão induzida por deformações e a ações estáticas causadas por mudanças contínuas na pressão arterial. Eles se originam de nervos aferentes do vago e nervos glossofaríngeos e se dirigem para o núcleo do trato solitário, que faz parte do centro vasomotor na medula oblonga. Impulsos destes receptores são inibitórios por natureza, assim, na hipertensão aguda os barorreflexos geram uma transmissão neuronal aumentada para o centro vasomotor, com consequente inibição do sistema simpático e aumento do tônus vagal (OPIE 1998). Essas mudanças reduzem a frequência e a contração cardíaca (GUYENET 2006) e diminuem a resistência vascular periférica. Dessa forma um aumento agudo na pressão arterial induz mudanças que tendem a reduzi-la. No caso de hipotensão aguda, há uma redução na distensão da pressão nos barorreceptores, resultando em uma diminuição da frequência de descarga reduzindo os sinais enviados ao centro vasomotor, o que leva à um aumento da atividade simpática e inibição do tônus vagal (OPIE 1998).

Alguns sistemas de controle dos níveis pressóricos, como a isquemia do sistema nervoso central, têm funções altamente especializadas. Nesse caso ocorre ativação quando o fluxo de sangue para o cérebro fica muito reduzido e dificulta a ativação normal dos neurônios. Um centro neural na medula responde transmitindo sinais fortes através dos nervos simpáticos para que o coração e vasos sanguíneos aumentem a pressão, em alguns casos chegando ao limite cardíaco máximo (GUYTON 1991).

Também ocorre a ativação dos quimiorreceptores devido às concentrações elevadas de  $\text{CO}_2$  (dióxido de carbono) e às baixas concentrações de  $\text{O}_2$  (oxigênio) no sangue, assim um sinal é enviado aos centros cerebrais de controle da pressão sanguínea, causando a redução da mesma. Esse controle é extremamente importante durante a atividade física, onde o consumo de  $\text{O}_2$  pelos músculos e a excreção de  $\text{CO}_2$  são igualmente elevados (GUYTON 1991).

O controle de longo prazo (horas ou dias) é feito principalmente pelos rins. Quando a pressão sobe além do normal os rins passam a excretar mais água e sal, isso reduz a volemia e faz com que o coração bombeie menos sangue, levando à queda da pressão arterial. Reciprocamente, quando a pressão cai

abaixo do normal, há um aumento no balanço entre fluídos que entram e saem, aumentando assim as concentrações dos líquidos e eletrólitos corporais e a pressão sanguínea (GUYTON 1991).

Os mecanismos intermediários são acionados minutos após a ativação dos controladores neurais da pressão. Um dos principais é o sistema renina-angiotensina, que tem função vasoconstritora ativada quando a baixa pressão sanguínea faz com que o fluxo de sangue para os rins caia abaixo do normal. Isso leva as células justaglomerulares dos rins a secretarem renina na corrente sanguínea. A renina é uma enzima glicoproteica que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela ECA. A angiotensina II causa vasoconstrição ao longo dos vasos sanguíneos corporais e conseqüentemente restabelece os níveis pressóricos normais (GUYTON 1991; CRACKOWER *et al.* 2002)

Opie propôs que a liberação de renina pelas células justaglomerulares ocorre em resposta a três estímulos principais: i) aumento da estimulação dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos; ii) redução da pressão arterial renal e iii) diminuição na reabsorção tubular de sódio ( $\text{Na}^+$ ). A liberação de renina é inibida pela angiotensina II através de um mecanismo de controle negativo (*feedback* negativo). Ela também estimula a liberação do hormônio aldosterona pelo córtex da adrenal, o qual aumenta a reabsorção de  $\text{Na}^+$  nos rins e diminui a liberação de renina (OPIE 1998).

Outros sistemas hormonais participam do controle da pressão sanguínea como por exemplo, o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina. O ADH é um hormônio (peptídeo) neuro-hipofisário envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo manutenção da homeostasia do sódio, regulação da osmolaridade, do tônus vascular e da contratilidade cardiovascular (ALI *et al.* 2007). Sua liberação ocorre com o aumento da osmolaridade plasmática, principalmente ao sódio ( $\text{Na}^+$ ), e redução da pressão intravascular. Atua aumentando a reabsorção de água pelos túbulos renais, sem interferir na eliminação de  $\text{Na}^+$ , isso contribui para a elevação da sobrecarga sanguínea e conseqüentemente da pressão arterial (LEE *et al.* 2003).

Outros peptídeos também constituem sistemas importantes no auxílio ao controle da pressão arterial. Dentre eles destacamos o peptídeo natriurético atrial



(PNA), que possui propriedades diuréticas/natriuréticas e vasodilatadoras, sendo que ambas contribuem para uma redução nos níveis pressóricos. Estes efeitos são mediados pela ligação do PNA a um receptor de superfície de membrana e este irá ativar a guanilato ciclase A (GC-A) que por sua vez aumentará as concentrações de guanosina 3', 5' – monofosfato cíclico (GMPc) que vai inibir a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) e causar vasodilatação (KU 2006). O PNA também contribui para a inibição da secreção de aldosterona e é antagonista endógeno da angiotensina II (OPIE 1998). Também merece relevância as endotelinas que são uma família de peptídeos que compreendem: endotelina 1 (ET-1), endotelina 2 (ET-2) e endotelina 3 (ET-3). Vale destacar que a ET-1 é a isoforma predominantemente expressa na musculatura lisa vascular e atua como um potente vasoconstritor promovendo a abertura de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e a formação de  $\text{IP}_3$  (trifosfato de inositol). As endotelinas também têm propriedades inotrópicas, quimiotáticas e mitógenas. Além disso, a ET-1 influencia a homeostasia de sais e água através dos seus efeitos sobre o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), vasopressina, peptídeo natriurético atrial e estímulo do sistema nervoso simpático (AGAPITOV e HAYNES 2002). Em condições fisiológicas normais tem ação vasodilatadora provavelmente por agir sobre o endotélio e promover a liberação de óxido nítrico (NO) (BRUNNER *et al.* 2006).

### 1.2.1 - Controle do tônus vascular

As células musculares lisas são encontradas constituindo as paredes de vários órgãos, incluindo os vasos. Estas células recebem inervação neural do sistema autônomo, além de serem controladas por hormônios, agentes autócrinos, parácrinos e outros sinais químicos locais. No organismo intacto o processo de contração de células do músculo liso é regulado principalmente pela ativação mecânica das proteínas contráteis actina e miosina. De modo simplificado pode-se dizer que a contração do músculo liso é iniciada como consequência do aumento da concentração citosólica do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), devido à liberação deste íon a partir dos estoques intracelulares e/ou entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. A ligação do cálcio com a calmodulina ativa a MLCK que leva a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) e permite sua interação com os

filamentos de actina resultando na contração muscular. A sensibilização de proteínas contráteis é sinalizada pela via RhoA/Rho-quinase (RhoA/ROCK) para inibir a defosforilação da cadeia leve pela miosina fosfatase, mantendo a força geradora de contração. A remoção do cálcio do citosol e estimulação da miosina fosfatase iniciam o processo de relaxamento do músculo liso (WEBB 2003). Além disso, diversos vasodilatadores agem sobre os níveis de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc) e de GMPc os quais ativam, respectivamente, a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase G (PKG). A PKA e a PKG fosforilam e inativam a MLCK, favorecendo a perda do tônus muscular. O estado de contração e relaxamento das células musculares lisas define assim o nível de pressão arterial e o aporte do fluxo sanguíneo em função das necessidades metabólicas (MICHEL 1998).

Além das células musculares lisas, os vasos possuem uma importante camada delgada de células (células endoteliais), formando a camada íntima do vaso. O endotélio produz uma variedade de substâncias que desempenham um papel importante na regulação da circulação sanguínea e homeostase vascular. Dentre os vasoconstritores liberados pelas células endoteliais podemos destacar alguns derivados do ácido araquidônico (MILLER e VANHOUTTE 1985), ânion superóxido (VANHOUTTE e KATUSIC 1988), endotelina (YANAGISAWA *et al.* 1988) e angiotensina II (VELTMAR *et al.* 1991). O endotélio induz o relaxamento vascular através de três mediadores principais: o NO (FURCHGOTT e ZAWADZKI 1980; HUTCHINSON *et al.* 1987; IGNARRO *et al.* 1987), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (MONCADA *et al.* 1976) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FELETOU e VANHOUTTE 1988). Através destes mediadores, o endotélio exerce sua influência no fluxo sanguíneo, nas células circulantes (como os leucócitos, as plaquetas) e ainda sobre substâncias envolvidas na coagulação sanguínea. Portanto, as células endoteliais contribuem ativamente para a modulação do tônus vascular na hipertensão. Além disso, alterações no endotélio estão relacionadas ao desenvolvimento de complicações aterotrombóticas associadas às doenças cardiovasculares (SCHIFFRIN 2001).

### 1.2.2 - Participação do sistema renal na manutenção da pressão arterial

A importância dos rins no controle da pressão arterial tem sido amplamente discutida ao longo do tempo. Há mais de 30 anos Guyton e colaboradores argumentaram que os rins tem papel fundamental na manutenção dos níveis pressóricos normais. O rim tem a capacidade de aumentar rapidamente a excreção urinária de sódio em resposta à elevação da pressão arterial (natriurese de pressão), reduzindo assim o volume dos fluidos corporais, fazendo com que o coração bombeie menos sangue e reestabelecendo os níveis pressóricos (GUYTON 1991). Os transportadores de sódio distribuídos ao longo do néfron são muito dinâmicos, respondendo rapidamente às flutuações normais da pressão sanguínea. Também são fundamentais para gerar o sinal de *feedback* negativo na macula densa, túbulo glomerular e para acomodar o volume aumentado através da alça de Henle (MCDONOUGH *et al.* 2003).

Além disso, anormalidades na função excretora renal podem estar envolvidas no aumento da pressão intra-arterial (MENETON *et al.* 2005). Também tem sido observado que a função renal é reduzida em pacientes com doenças cardiovasculares (ANAVEKAR *et al.* 2004). Corroborando as afirmações, ratos com níveis pressóricos normais que foram transplantados com rim oriundo de animais hipertensos, tornaram-se também hipertensos após o transplante. Por outro lado, ratos hipertensos que receberam o rim proveniente de indivíduos normotensos, tiveram o restabelecimento da pressão arterial (RETTIG e GRISK 2005).

Há alguns anos foi proposto que o desenvolvimento da hipertensão está relacionado com a expressão renal de receptores para angiotensina II tipo 1 (AT1) (CROWLEY *et al.* 2006). Estudos utilizando imunohistoquímica demonstraram a presença abundante de AT1R na superfície luminal dos túbulos proximal e distal, bem como nas células musculares lisas de arteríolas aferentes e eferentes (NAVAR *et al.* 2000). Estudo realizado por Crowley e colaboradores sugere que a presença desses receptores no tecido renal foi suficiente para gerar um fenótipo de hipertensão e sua ausência conferiu proteção contra tal quadro, mesmo que outros tecidos tenham mantido a expressão normal desses receptores (CROWLEY *et al.* 2005). De acordo com Navar e cols, a ativação luminal de receptores AT1 estimula a troca sódio/hidrogênio ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) e aumenta a taxa de

reabsorção. Sendo assim os rins são um importante sítio de ação para os bloqueadores de receptores AT1, porque a angiotensina II intrarenal, além de atuar como vasoconstritor nos vasos renais, também reduz a excreção de sódio e suprime a natriurese de pressão.

O receptor AT1 possui dois subtipos, AT1<sub>A</sub> e AT1<sub>B</sub>, ambos abundantemente expressos nos rins (CAREY 1999). Recentemente foi sugerido que a ação da angiotensina II nos receptores renais pode estar relacionada com os receptores AT1 subtipo A (AT1<sub>A</sub>). A eliminação dos receptores AT1<sub>A</sub> para angiotensina II do epitélio do túbulo proximal renal atenuou a hipertensão apesar de manter a resposta pressora dependente de angiotensina totalmente preservada. Tal efeito foi relacionado à excreção facilitada de sódio, sugerindo o envolvimento do receptor AT1<sub>A</sub> na natriurese de pressão (GURLEY *et al.* 2011). Também foi confirmado que a super expressão de receptor AT1<sub>A</sub> em células epiteliais do túbulo proximal renal aumenta a pressão arterial (LI *et al.* 2011). Navar e colaboradores propõe que o túbulo proximal renal é uma fonte de angiotensinogênio e angiotensina II para o ultrafiltrado glomerular e pode, portanto, ter ampla influência na função do néfron e controle da pressão arterial (NAVAR *et al.* 2011).

Tem sido demonstrado que bloqueadores receptores AT1 (como o candesartan) causam aumento significativo da taxa de filtração glomerular, do fluxo sanguíneo renal proporcionalmente com aumento da excreção de sódio (NAVAR *et al.* 2000). Além disso, ratos espontaneamente hipertensos (SHR), expostos a dieta *high salt*<sup>1</sup> (8%) e tratados com bloqueador AT1R tiveram melhora na hemodinâmica renal (VARAGIC *et al.* 2008). Assim, pode-se dizer que a ação dessa classe de fármacos no transporte tubular e hemodinâmica renal proporciona um efeito de longo prazo na regulação do balanço de sódio, que pode contribuir, pelo menos em parte, para a redução dos níveis pressóricos (NAVAR *et al.* 2000).

---

<sup>1</sup> O termo *high-salt* (do inglês, que refere-se à dieta com excesso de sal) será usado algumas vezes ao longo da tese.

### 1.2.3 - Envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) na homeostasia dos níveis pressóricos

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) participa da regulação do tônus vascular, volume de fluidos corporais, balanço eletrolítico, secreção hormonal e atividade neuronal (GONZALEZ *et al.* 2005). Alguns autores consideram que o principal papel do SRAA é a regulação da pressão arterial (WANG *et al.* 2007). A cascata molecular desse sistema é ativada por fatores que reduzem o volume circulante de sangue e reduzem a pressão de perfusão renal, ou reduzem as concentrações tubulares de cloreto de sódio (TOMASCHITZ *et al.* 2010). Isso faz com que as células justaglomerulares dos rins secretem renina e a liberem na corrente sanguínea. A renina é uma enzima glicoproteica que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela ECA. A angiotensina II causa constrição ao longo dos vasos sanguíneos corporais e, conseqüentemente, restabelece os níveis pressóricos normais (GUYTON 1991; CRACKOWER *et al.* 2002). Além disso, a interação sinérgica entre aldosterona e angiotensina II nas células endoteliais e nas células musculares lisas dos vasos causa dano direto nos órgãos alvos, mas indiretamente também promove inflamação vascular, fibrose, remodelamento e hipertensão (XIAO *et al.* 2004).

De modo geral é possível dizer que o SRAA restabelece a homeostasia circulatória. Simplificadamente a ação do SRAA que modula a pressão arterial pode ser agrupada em três categorias: i) ativação rápida para compensar a hipovolemia e hipotensão, que ocorre através da estimulação da síntese de aldosterona adrenal; ii) ativação intermediária que interfere com a homeostasia do sal; iii) ativação a longo prazo que contribui para as alterações estruturais do tecido alvo como por exemplo o remodelamento vascular (KAPPER e UNGER, 2008) . Entretanto a ativação contínua desse sistema pode estar envolvida no desenvolvimento e progressão da hipertensão (TOMASCHITZ *et al.* 2010).

Os efeitos biológicos da angiotensina II, considerada o principal peptídeo efetor na vasculatura, são mediados por duas isoformas de receptores (ELTON *et al.* 1992; KAMBAYASHI *et al.* 1993; GONZALEZ *et al.* 2005). O receptor para angiotensina II do tipo 2 (AT2) é extensamente expresso durante o desenvolvimento fetal, enquanto nos adultos a expressão foi detectada em

diferentes tecidos incluindo mesentéricas, coronárias e artérias renais. O receptor AT1 pode mediar vasoconstrição, facilitação simpática e efeitos tróficos (ARDAILLOU 1999). Alguns autores consideram que o receptor AT2 tem efeito antagônico ao receptor AT1, como por exemplo: o receptor AT2 atenua a ação pressórica da angiotensina II e medeia vasodilatação (MATROUGUI *et al.* 1999; SIRAGY *et al.* 1999). Além disso, existem evidências sugerindo a existência de um *crosstalk* entre aldosterona e a via regulada por angiotensina II e o receptor AT1 (LEMARIE *et al.* 2008) e por aldosterona e receptor mineralocorticoide em cardiomiócitos e células musculares lisas vasculares (JAFFE e MENDELSON 2005). A interação entre aldosterona e angiotensina II em células do músculo liso vascular também leva a potencialização do efeito proliferativo da angiotensina II (XIAO *et al.* 2004).

A angiotensina II é considerada o maior mediador de remodelamento vascular (HIGUCHI *et al.* 2007). Esse peptídeo, também promove mudanças metabólicas e funcionais a curto e longo prazo, principalmente pela ativação de receptor AT1 localizado nas células do músculo liso vascular (FAILLI *et al.* 2009). Também tem atividade pro-inflamatória, hipertrófica (FRANK e EGUCHI 2003), fibrótica e efeitos metabólicos que incluem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TOUYZ 2005), resistência à insulina (IZAWA *et al.* 2005), deposição de proteína na matriz extracelular (NAFTILAN *et al.* 1989; TOUYZ *et al.* 1999; ZHAI *et al.* 2005; HIGUCHI *et al.* 2007), estimulação de diferenciação e migração celular (POWELL *et al.* 1989). Dentre os sinais intracelulares, a ativação de receptores AT1 aumenta os níveis de cálcio e ativa algumas quinases, incluindo a via Rho quinase (ROCK) (LOIRAND *et al.* 2006; HIGUCHI *et al.* 2007).

Apesar da extensa gama de trabalhos estudando a funcionalidade do SRAA em animais e alguns poucos em humanos submetidos a dieta *high salt* alguns aspectos ainda parecem não estar completamente esclarecidos. Por exemplo, a expressão de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (RNAm) para AT1R foi reduzida em aorta e rins, mas aumentada em homogenato de cérebro de ratos da linhagem *Dahl* sal sensíveis expostos a dieta *high salt* (STREHLOW *et al.* 1999). Em ratos Sprague-Dawley altas quantidades de sódio aumentam tanto os níveis de RNAm quanto a expressão de proteínas de AT1R em aorta e



cultura de células musculares lisas (NICKENIG *et al.* 1998). Porém, em artérias mesentéricas há uma redução do RNAm para receptor AT<sub>2</sub>, sem alterar a expressão de RNAm para receptor AT<sub>1</sub> (GONZALEZ *et al.* 2005). Além da dieta *high salt* estar envolvida tanto com aumento quanto com a redução de receptores para angiotensina II, esta também tem sido descrita como responsável por aumentar ou diminuir a atividade e os níveis circulantes ou teciduais de renina, angiotensinogênio, ECA, angiotensina II e aldosterona (HODGE *et al.* 2002; BAYORH *et al.* 2005; GONZALEZ *et al.* 2005; DOS SANTOS *et al.* 2006).

A existência de um número tão grande de resultados contraditórios na literatura em relação às alterações cardiovasculares (especialmente no SRAA) induzidas por dieta *high salt*, pode ser, ao menos em parte, uma consequência da grande variedade de abordagens experimentais adotadas, a comparação entre os resultados obtidos de diferentes linhagens de ratos ou animais de diferentes idades, bem como o período de exposição ao sódio e as quantidades de sódio utilizadas. Porém, é importante ressaltar que a maioria dos estudos demonstraram alterações em pontos específicos do SRAA e foram realizados com animais sensíveis ao sal (*Dahl* sal sensíveis), submetidos ao tratamento simultâneo com acetato de desoxicorticosterona (DOCA-sal) ou ratos SHR. Poucos estudos foram feitos utilizando animais normotensos e saudáveis.

#### **1.2.4 - Via Rho quinase e sistema vascular**

A RhoA é um membro da superfamília de proteínas ligadas a proteína G pequena, que ativa a proteína quinase serina/treonina, conhecida como ROCK (SAKURADA *et al.* 2001). A RhoA pode ser ativada por vários agentes vasoativos, incluindo agonistas  $\alpha$ 1-adrenérgicos (KOKUBU *et al.* 1995; NISHIMURA *et al.* 1996) e angiotensina II (LEUNG *et al.* 1995). Essa atividade é regulada pela ligação de GTP, um processo facilitado por fatores de troca de nucleotídeo guanina (Rho-GEFs), os quais permitem a troca de RhoA-GDP para RhoA-GTP (SCHMIDT e HALL 2002). A ativação da RhoA leva a estimulação da ROCK, que subsequentemente fosforila a subunidade 1 da miosina fosfatase (MYPT1) (KIMURA *et al.* 1996). Isso faz com que a MYPT1 seja inativada, favorecendo a manutenção da fosforilação da MLC, interação actina-miosina e contração celular (HILGERS e WEBB 2005; DA SILVA-SANTOS *et al.* 2009).

Nas últimas décadas, uma atenção considerável tem sido dirigida à possibilidade de que o aumento na resistência periférica existente na hipertensão seja causada por uma alteração no músculo liso vascular que o torna mais sensível do que o normal a estímulos constritores. Evidências obtidas nos últimos anos sugerem que esse aumento na sensibilidade vascular, ocorrido na hipertensão reflete, ao menos em parte, uma regulação aumentada da fosforilação da cadeia leve de miosina pela via RhoA/ROCK. Essa ideia tem sido reforçada por estudos com modelos animais de hipertensão e pacientes humanos hipertensos, os quais demonstraram que uma regulação positiva da via RhoA/ROCK é responsável pelo aumento da sensibilização ao cálcio e isto contribui para a elevação da pressão arterial (UEHATA *et al.* 1997; MASUMOTO *et al.* 2001; SEASHOLTZ *et al.* 2006; HILGERS *et al.* 2007). Nesse sentido, o tratamento com o composto Y-27632, um inibidor altamente seletivo da enzima Rho-quinase, é capaz de reduzir significativamente a pressão arterial em modelos de hipertensão já instalada (ratos DOCA-sal, 2-rins/1-clipe e animais espontaneamente hipertensos) (UEHATA *et al.* 1997).

Nos últimos anos, tanto a RhoA como especialmente a ROCK estão sendo consideradas alvos em potencial para o desenvolvimento de drogas visando o tratamento de patologias cardiovasculares (MUKAI *et al.* 2001; SHIMOKAWA e TAKESHITA 2005), muito embora a segurança dessas drogas em termos de efeitos tóxicos, relacionados a ampla presença dessa via em diferentes tipos celulares tenha sido um evento extremamente limitante. Estudos em animais demonstraram que o tratamento, de curto prazo, utilizando inibidores de ROCK reduz a lesão de reperfusão em ratos e cães (SHIMOKAWA e TAKESHITA 2005), enquanto o tratamento prolongado com baixas doses desses inibidores não altera a pressão arterial, mas reduz o surgimento de lesões em artérias coronárias de pequeno calibre de ratos SHR (MUKAI *et al.* 2001).

Respostas vasoconstritoras aumentadas à noradrenalina, observadas em artérias mesentéricas de ratos hipertensos (DOCA-sal), parecem ser mediadas, ao menos em parte, pela ativação da ROCK (MATSUMURA *et al.* 2001). Além disso, as respostas vasodilatadoras ao inibidor da ROCK fasudil no ante-braço de humanos hipertensos foram maiores do que as observadas em indivíduos normotensos (MASUMOTO *et al.* 2001), assim como em artérias mesentéricas de

ratos com hipertensão induzida pela administração de mineralocorticóides (WEBER e WEBB 2001). Corroborando esses dados, Jin e colaboradores mostraram que na hipertensão induzida pela angiotensina II, o tônus basal de anéis de aorta *in vitro* está aumentado, e este evento está associado com a elevação da expressão da enzima RhoA e é revertido tanto pela inibição da ROCK como da enzima NADPH oxidase (JIN *et al.* 2006).

#### **1.2.5 - A participação dos canais de cálcio no controle da pressão arterial**

Os canais de cálcio, localizados na membrana celular, são importantes para a regulação da pressão sanguínea, já que garantem o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extra para o intracelular. O cálcio oriundo do meio extracelular soma-se ao cálcio liberado do retículo endoplasmático, complexando-se com a proteína calmodulina ácida. Este complexo ativa a MLCK, que fosforila a MLC, a qual interage com a actina promovendo a contração da célula e, no nosso enfoque, do tecido vascular. Como descrevemos anteriormente, uma das grandes descobertas das últimas décadas é que o efeito do cálcio é amplificado pela via RhoA/ROCK, através da inibição da miosina fosfatase, responsável pelo contrabalanço e inibição da contração mediada pelo cálcio.

Diversos fatores e estruturas intracelulares já são bem descritos como capazes de influenciar e regular a disponibilidade de cálcio intracelular. Dentre eles podemos citar os canais de cálcio de membrana, que permanecem fechados quando ocorre hiperpolarização, como aquela, mediada pela abertura de canais de potássio ( $\text{K}^+$ ), como por exemplo os canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) (JAGGAR 2001; WIER e MORGAN 2003). Isso reduz a entrada de cálcio para o meio intracelular e, por isso, resulta em relaxamento vascular. Baseados principalmente nesse mecanismo fisiológico de controle do tônus vascular, tanto abridores de canais de potássio como bloqueadores de canais de cálcio são utilizados (estes últimos com maior frequência) na clínica médica para o tratamento da hipertensão arterial.

A liberação de cálcio do retículo endoplasmático, embora ainda não seja alvo de drogas utilizadas em humanos, também é um mecanismo crucial para a regulação da concentração de cálcio intracelular livre e, portanto, da contração celular e vascular. Em células do músculo liso vascular a liberação de cálcio

intracelular está envolvida, principalmente com dois canais: o 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e os canais de rianodina (HADDOCK e HILL 2002). Esses canais funcionam como receptores para mediadores endógenos como o próprio  $IP_3$ , ou ferramentas farmacológicas, como a cafeína no caso do receptor rianodina (WATRAS e BENEVOLENSKY 1987). As mudanças de resposta envolvendo cálcio intracelular podem ocorrer devido a alterações nos canais de cálcio intracelular, modificações no local de armazenamento do  $Ca^{2+}$  (retículo endoplasmático), ou ainda na  $Ca^{2+}$ -ATPase envolvida na recaptação do cálcio do citoplasma (SERCA) (SEARLS *et al.* 2010). Além dos mecanismos dependentes da  $Ca^{2+}$ -ATPase, outros mecanismos podem contribuir para o aumento da recaptação do cálcio no retículo endoplasmático como por exemplo: i) alterações em proteínas de estocagem de cálcio do retículo endoplasmático como calreticulina e calsequestrina (NIKI *et al.* 1996; GU *et al.* 2008); ii) alterações na sinalização em condições de depleção do retículo endoplasmático, o que leva a ativação de canais de cálcio na membrana plasmática (LIOU *et al.* 2005; ROOS *et al.* 2005). O último processo mencionado tem a participação das moléculas de interação estromal 1 (STIM1) e Orai1. A STIM1 é uma proteína descrita como sensor de cálcio no retículo endoplasmático (LIOU *et al.* 2005) e a Orai1 é uma proteína que constitui os canais de cálcio ativados pela liberação de cálcio intracelular (PRAKRIYA *et al.* 2006).

A importância e a participação do cálcio na hipertensão continuam sendo foco de um grande número de estudos pré-clínicos. Exemplos de estudos recentes incluem a demonstração de aumento do influxo de cálcio por canais de membrana voltagem dependentes (PINTEROVA *et al.* 2009), benefícios e efeitos deletérios do uso crônico de bloqueadores de canais de cálcio como o nifedipino em ratos espontaneamente hipertensos (ZEMANCIKOVA e TOROK 2009; PINTEROVA *et al.* 2010), e a redução da hiperpolarização mediada por canais de potássio de membrana como um mecanismo de aumento do influxo de cálcio na hipertensão espontânea (WESTON *et al.* 2010). Apesar disso, a existência de alterações na mobilização de estoques intracelulares de cálcio na hipertensão permanece controversa e pouco estudada. Por exemplo, Arai *et al.* (1999) demonstrou que apesar da existência de aumento de influxo de cálcio por canais de cálcio, a liberação de cálcio intracelular pelo próprio cálcio não é alterada em

arteríolas de ratos espontaneamente hipertensos (ARII *et al.* 1999). Por sua vez, outros autores sugerem que a elevação de influxo de cálcio por canais de cálcio aumenta a captação intracelular desse íon, que é liberado em quantidades maiores após estímulos vasoconstritores, contribuindo para o aumento do tônus de artérias femorais de ratos hipertensos (NOMURA *et al.* 1997). Por sua vez, a principal especulação de um estudo publicado por Toyoda e colaboradores, usando artérias de resistência de ratos jovens espontaneamente hipertensos foi que, apesar do influxo aumentado de cálcio, o retículo endoplasmático dos vasos desses animais é capaz de armazenar quantidades maiores de cálcio, o que poderia impedir o aumento da pressão arterial nas primeiras semanas de vida desses animais (TOYODA *et al.* 1995).

Se por um lado o conhecimento acerca da importância dos mecanismos regulatórios de disponibilidade intracelular de cálcio em modelos de hipertensão parece confuso, por outro, quase nada foi avaliado com relação ao potencial envolvimento dessa via nas alterações cardiovasculares que podem ocorrer após a exposição prolongada a quantidades elevadas de sal. Um estudo isolado, publicado por Ashida e colaboradores, sugere que a aorta de ratos hipertensos do tipo sensíveis ao sal, quando expostos à dieta hipersódica, apresenta aumento na entrada de cálcio extracelular e alterações (não exploradas no estudo) na formação e liberação de reservas de cálcio intracelular (ASHIDA *et al.* 1992). Corroborando esse estudo, porém também sem explorar qualquer envolvimento de reservas intracelulares de cálcio, outros autores mostraram que ratos expostos à dieta *high salt* 8% durante 9 dias apresentam aumento no influxo de cálcio estimulado pela endotelina, mas não pela fenilefrina (SMITH *et al.* 2003).

### **1.3 - Dieta rica em sal x hipertensão**

Além dos mecanismos endógenos de controle da pressão arterial, outros fatores descritos como ambientais podem influenciar na manutenção dos níveis pressóricos. Por isso o *Joint National Committee (JNC) on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* dos Estados Unidos, em seu sétimo relatório recomenda que o tratamento farmacológico seja acompanhado de uma mudança no estilo de vida dos pacientes (CHOBANIAN *et al.* 2003). Essas recomendações do comitê norte americano corroboram com as orientações dadas

pela Sociedade Brasileira de Hipertensão em sua VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC/SBH 2010). De acordo com essas recomendações a primeira linha de tratamento para a pressão arterial elevada é a modificação do estilo de vida e fatores de risco como peso, atividade física, redução da ingestão de sal, consumo de álcool e tabagismo, dentre outros.

Dentre estes fatores externos que podem influenciar a pressão arterial, a dieta elevada de sal tem se destacado como importante contribuinte no desenvolvimento da hipertensão. Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação entre ingestão elevada de sal e aumento da pressão arterial em um percentual que varia de 30% a 50% dos casos de hipertensão (GRIM *et al.* 1980; ORLOV e MONGIN 2007). Já está bem demonstrado, através de estudos pré-clínicos, que excesso de sal provoca remodelamento vascular e aumento da massa do ventrículo cardíaco esquerdo, bem como maior incidência de acidentes vasculares cerebrais, independente da elevação dos níveis pressóricos (MUNTZEL e DRUEKE 1992; RAPP 2000; MENETON *et al.* 2005).

Nesse contexto, em 2011, o Ministério da Saúde juntamente com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e a Associação Brasileira dos Supermercados (Abras) lançaram uma campanha com objetivo de conscientizar a população sobre o consumo excessivo de sódio e as consequências para a saúde. A campanha que recebeu o nome de “Menos sal, sua saúde agradece” visa uma redução gradual da taxa de sódio para ser cumprida até 2012 e, depois, intensificada nos anos seguintes. A meta é atingir o consumo diário recomendado pela OMS até 2022, como parte do Plano de Ações Estratégicas para Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT). Segundo dados da Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição do Ministério da Saúde, o consumo individual de sal nos domicílios brasileiros é de 12 gramas diários, o que representa mais do que o dobro da quantidade recomendada pela OMS que é, no máximo, 5 gramas por dia. A situação é preocupante principalmente entre os adolescentes onde a ingestão elevada de sódio foi observada em mais de 90% dos indivíduos com faixa etária entre 14 e 18 anos. São eles que mais consomem alimentos como pizza, embutidos, salgadinhos, macarrão instantâneo, biscoitos recheados e refrigerantes, considerados alimentos com alta concentração de



sódio e responsáveis, em grande parte, pelo excesso de sal na dieta dos brasileiros (Ministério da Saúde, 2012).

De acordo com alguns autores a dieta *high-salt* pode levar ao desenvolvimento de hipertensão e complicações cardiovasculares por aumentar a concentração extracelular de sódio ( $\text{Na}^+$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e concentração e/ou osmolaridade extracelular de fluidos (ALDERMAN 2007). Um estudo recente demonstrou que ratos normotensos tratados com dieta *high-salt* 4% por 3 dias têm a produção basal de superóxido aumentada nas artérias mesentéricas. Os autores sugeriram que essa alteração contribui para o desenvolvimento do estresse oxidativo e, que isso pode estar relacionado com o aumento precoce da resistência vascular em modelos de hipertensão sensíveis ao sal e possível regulação da perfusão tecidual em indivíduos normotensos expostos a dieta *high-salt* (ZHU *et al.* 2007). Corroborando esses dados, outros autores sugerem que a dieta elevada de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$  7%) leva ao aumento da atividade oxidante, redução da disponibilidade de NO e redução da resposta dependente de endotélio em arteríolas do músculo esquelético de camundongos (NURKIEWICZ e BOEGEHOLD 2007).

Estudos demonstraram que ratos *Wistar* tratados com dieta rica em sal (1,8%) durante 4 semanas tiveram elevação da pressão arterial e aumento da resposta à fenilefrina no leito vascular da cauda, porém não ocorreram alterações vasculares renais. De acordo com os autores a maior responsividade à fenilefrina é mediada pelo aumento da produção de angiotensina II devido ao aumento da atividade local da ECA, mas não está relacionada à disponibilidade de NO ou liberação de produtos derivados da cicloxigenase (COX) endotelial (DOS SANTOS *et al.* 2006). Por outro lado, outros autores propõem que a ingesta de sal em grandes concentrações reduz a função do sistema cinina-caliceína renal e isto pode ser o elo entre a dieta *high-salt* e a hipertensão (KATORI e MAJIMA 2006).

Alguns trabalhos sugerem uma estreita relação entre a dieta elevada de sal e o SRAA. Um estudo realizado por Johansson e colaboradores indica que camundongos fêmeas *knockout* para ApoE ( $\text{ApoE}^{-/-}$ ) expostos a dieta *high-salt* (8%) não apresentam mudanças nos níveis pressóricos, somente propensão moderada ao desenvolvimento de aterosclerose. Entretanto a angiotensina II

combinada com a dieta rica em NaCl atuam sinergicamente e aceleram o desenvolvimento de aterosclerose em aorta torácica, concomitante com o aumento do estresse oxidativo (JOHANSSON *et al.* 2009).

Frente a esses dados aqui apresentados e considerando que poucos estudos foram desenvolvidos utilizando ratos jovens saudáveis normotensos, objetivamos investigar as alterações cardiovasculares induzidas pela exposição ao excesso de sal desde as primeiras semanas de vida dos animais até a idade de adulto jovem. Nesse sentido, acreditamos que a compreensão das alterações e/ou fatores que possam contribuir para o aparecimento de doenças cardiovasculares e hipertensão seja crucial para a prevenção de tais patologias bem como para descoberta de novos alvos terapêuticos.

## II - HIPÓTESE

O sal é um condimento utilizado pelos seres humanos há cerca de dez mil anos, com o objetivo de conservar os alimentos (TWARDOWSKI 2008). Atualmente, apesar de existirem formas mais modernas de conservação da comida o consumo de sal continua elevado, isso porque o ser humano passou a fazer uso do sal para melhorar o sabor dos alimentos. Dessa forma a população é exposta a quantidades elevadas de cloreto de sódio desde os primeiros meses de vida, quando recebe as primeiras “papinhas”, sendo que tal exposição pode se manter por toda a existência do indivíduo. Apesar dos esforços da comunidade científica em propor fatores que possam relacionar o aumento da pressão arterial ao excesso de sal ingerido, ainda não há explicações satisfatórias acerca das mudanças funcionais e moleculares ocorridas (KATORI e MAJIMA 2006), principalmente nos indivíduos que não são sensíveis ao sal, em termos de desenvolvimento de hipertensão.

Levando em conta esses aspectos e a importância de uma melhor compreensão acerca dos efeitos do excesso de sal no sistema cardiovascular de indivíduos não sensíveis ao sal ou previamente hipertensos, hipotetizamos que a ingesta elevada de NaCl desde o desmame até a idade adulta é capaz de induzir alterações funcionais e moleculares no sistema cardiovascular, como por exemplo maior atividade da via RhoA/ROCK, o que por sua vez influencia a via do cálcio. Idealizamos ainda que essas alterações podem preceder um quadro de hipertensão. Se nossa hipótese estiver correta esses achados podem vir a ser um dos primeiros passos para o desenvolvimento de terapias inovadoras para a hipertensão, ou até mesmo para a implementação de estratégias que visem interromper a sequência de eventos que levam à instalação da hipertensão.

### III - OBJETIVOS

#### 3.1 - Objetivo geral

Investigar as possíveis alterações cardiovasculares ocorridas em ratos normotensos expostos a uma dieta elevada de cloreto de sódio (*high-salt*) e avaliar quais as principais vias de sinalização que estão envolvidas nas prováveis respostas modificadas.

#### 3.2 - Objetivos específicos

- Avaliar os níveis pressóricos de ratos expostos à dieta com altas concentrações de NaCl;
- Verificar a responsividade vascular dos animais *high-salt* a agentes vasoconstritores e vasodilatadores *in vivo* e *in vitro*;
- Investigar a atividade da ECA no plasma de ratos *high-salt*;
- Avaliar os níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona em ratos expostos a dieta *high salt*;
- Verificar a expressão de receptores para angiotensina II (AT1 e AT2) em aorta de ratos *high salt*;
- Investigar as alterações de volume e eletrólitos urinário induzidas pela dieta com altas concentrações de NaCl;
- Avaliar a funcionalidade da via RhoA/ROCK em aorta e mesentéricas de resistência;
- Verificar a translocação/ativação da RhoA em aorta de ratos expostos a dieta com excesso de sal;
- Investigar a atividade da miosina fosfatase através da fosforilação da MYPT1;
- Avaliar a ativação da MLC em aorta isolada de ratos *high salt*;
- Verificar a funcionalidade dos canais de cálcio extra e intracelulares em aorta e mesentéricas de resistência;
- Verificar o influxo de cálcio em células de músculo liso vascular de animais expostos à dieta com excesso de sal;

- Investigar a liberação de cálcio do retículo endoplasmático através dos receptores IP3 e de rianodina;
- Verificar a recaptção de cálcio do citosol para o retículo endoplasmático através da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA);
- Avaliar a expressão de proteínas importantes no processo contrátil, como por exemplo, calmodulina, quinase dependente da  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CAMKII) e MLCK.

## IV – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Drogas

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais: angiotensina I, angiotensina II, bradicinina, hipuril-L-histidil-L-leucina (Hip-His-Leu), acetilcolina, fenilefrina, nitroprussiato de sódio, composto Y-27632, cafeína, inibidores de proteases, ortovanadato de sódio, fluoreto fenilmetanesulfonil (PMSF), papaína, collagenase I, elastase e D-ditiotreitol (DTT) comprados da Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). O Reagente de extração de proteína do tecido (T-per) e o anticorpo anti-Ca<sup>2+</sup>-ATPase tipo 3 (SERCA3) foram adquiridos da Thermo Fischer Scientific (Rockford, IL, USA). Tampão tris-HCl, tampão tris-glicina, glicina, persulfato de amônia (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS), albumina sérica bovina, leite sem gordura (Milk) e acrilamida foram comprados de Bio-rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Os anticorpos anti-angiotensina I e II foram fabricados pela Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). Os anticorpos para RhoA, ROCKII, ROCKI, cadeia leve de miosina (MLC), cadeia leve de miosina fosforilada (pMLC), calmodulina (CAM), proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup>-camodulina II (CAMKII), Ca-ATPase tipo 2 (SERCA2) e receptor trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). O anticorpo anti-RhoE foi comprado da Millipore Corporation (Billerica, Ma, USA). Os anticorpos para rianodina, quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) e fosfolambam foram adquiridos da Abcam (Cambridge, MA, USA). Os anticorpos para STIM1 e ORAI1 foram adquiridos da ProSci Incorporated (Poway, CA, USA). Os sais utilizados para o preparo das soluções nutritivas (PSS - solução salina fisiológica e KCl) foram adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). As soluções estoque de bradicinina, angiotensina I e II foram dissolvidos em ácido clorídrico (HCl 0,1 N) e diluídos em solução salina (0,9%) ou solução de PSS, antes do experimento, de acordo com o protocolo.

## 4.2 - Animais

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* (variedade *Wistar*) machos, com 21 dias de idade no início do tratamento que foi mantido por 45 dias. Os experimentos onde avaliamos a pressão arterial em ratos anestesiados, com aorta isolada, diurese, níveis de ECA e aldosterona foram realizados com ratos fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os demais protocolos foram realizados com ratos adquiridos da *Harlan Laboratories* (Indianapolis, IN, USA). Até a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e ração. A temperatura ambiente foi mantida em  $22 \pm 2$  °C e o ciclo claro/escuro de 12 horas.

O estudo foi desenvolvido usando quatro diferentes grupos experimentais. O primeiro grupo, denominado controle, recebeu ração comercial padrão contendo quantidade regular de cloreto de sódio (0,27%). Os outros três grupos foram expostos a ração contendo 2, 4 ou 8% de NaCl. A exposição à dieta com concentrações elevadas de NaCl iniciou-se no dia do desmame dos animais (21 dias de idade) e foi mantida por 6 semanas, quando os experimentos foram realizados. A ração ou farelo utilizado na preparação da dieta *high salt* foram adquiridos da Nuvital®, (Curitiba, PR, Brasil) ou Teklad Global Diets®, (Indianapolis, IN, USA). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (autorização número 345) ou pelo comitê local da Georgia Health Sciences University (autorizações número 2009-0226; 2009-0227 e 2011-0353).

## 4.3 - Registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administrada pela via intramuscular e suplementada a intervalos de 45-60 minutos. Após a fixação do animal em decúbito ventral, a veia femoral esquerda foi localizada e dissecada para inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno (PE 10), destinado à administração das drogas e soluções empregadas neste estudo. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina, diluída em solução salina, foi administrada para prevenir coágulos

e obstrução das cânulas. Todos os animais foram submetidos à traqueostomia e mantidos sob respiração espontânea. A artéria carótida esquerda de cada animal foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na altura de sua extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um catéter de polietileno (PE 20), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria. Os registros de pressão arterial foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, Austrália), conectados a um computador Macintosh com software de integração (Chart v 4, PowerLab/MacLab, AD Instruments, Austrália). Ao final dos experimentos, todos os animais foram mortos por uma overdose de tiopental (superior a 40 mg/Kg por via intravenosa - i.v.).

#### **4.4 - Registro indireto da pressão arterial sistólica em ratos acordados**

A pressão arterial sistólica em animal acordado foi avaliada utilizando o método de captação de pressão na cauda (*tail cuff*). A mensuração foi feita de forma não invasiva através da determinação do volume de sangue da cauda com um sensor que registrou o volume após a oclusão feita com uma braçadeira. O sensor estava acoplado a um computador com software que fez o registro da pressão arterial sistólica (CODA System, Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Esses experimentos foram conduzidos em sala com temperatura ambiente de 26-28 °C.

#### **4.5 - Avaliação da diurese dos animais *high-salt***

Para determinação da diurese o protocolo foi adaptado de Kau e colaboradores (KAU *et al.* 1984). O volume de excreção urinária acumulado durante 8 horas (das 8:00 as 16:00 horas) foi coletado e calculado em relação ao peso corporal e expresso como ml/100 gramas de peso do animal. O pH foi determinado em amostras frescas de urina, utilizando um pHmetro (modelo PG 2000, Gehaka, São Paulo, Brasil). A densidade foi avaliada pelo peso da amostra



em balança analítica (modelo FA-2104N, Bioprecisa, Curitiba, Brasil) em relação ao volume mensurado com o auxílio de micropipetas. Em seguida a urina foi filtrada e armazenada a -20 °C para posterior quantificação de sódio e potássio.

#### **4.6 - Registro das alterações vasculares de aorta e pequenas artérias mesentéricas isoladas de rato**

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de xilazina e cetamina (20/100 mg/kg) por via intramuscular para a retirada da aorta. Para remoção da artéria mesentérica os animais foram anestesiados com isoflurano por via inalatória. A aorta torácica descendente e/ou a artéria mesentérica de segunda ordem<sup>2</sup> foi retirada, tendo seu tecido conectivo removido. Em seguida, o vaso foi seccionado em anéis medindo aproximadamente quatro (aorta) ou três (mesentérica) milímetros de comprimento. Esses anéis foram acondicionados, através de hastes conectadas a transdutores, em cubas contendo solução nutritiva PSS (concentração em mmol/L: NaCl 130.3, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.17, glicose 5.5, NaHCO<sub>3</sub> 14.9), aerados com carbogênio (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), mantidos em temperatura de 37 °C e submetidos a tensão de 3 gramas (29,5 mN para aorta) ou 2.5 mN, que equivale a aproximadamente 0,25 g em preparações de mesentérica. Foi adotado um intervalo de uma hora com trocas da solução nutritiva a cada 15 min, para estabilização das preparações. Após esse período, as preparações foram contraídas com solução de cloreto de potássio (KCl – 120 mmol/L). Meia hora depois, foi induzida nova contração por fenilefrina (1 µM, aorta; 10 µM, mesentérica), seguida de adição de acetilcolina (1 µM; aorta; 10 µM, mesentérica), para obtenção de relaxamento, o qual indicou a presença de endotélio funcional ou ausência do mesmo. Para remoção do endotélio os anéis de aorta foram levemente friccionados e os vasos da artéria mesentérica tiveram um fio de cabelo introduzido em seu lúmen para a completa retirada da parede endotelial sem lesão da camada muscular lisa.

---

<sup>2</sup> As artérias mesentéricas fornecem aporte sanguíneo para o intestino delgado. É constituído pela artéria mesentérica superior que se ramifica em artérias de primeira ordem, segunda ordem (15 a 25 µm) e terceira ordem.

Os registros para aorta foram obtidos por meio de transdutores isométricos (modelo TRI 210 da Letica Scientific Instruments, Espanha), acoplados a um amplificador de sinais conectado a um computador com software de integração (Chart v 4.0, MacLab, AD Instruments, Austrália). Para avaliação das mudanças de tônus da artéria mesentérica foi usado miógrafo (Danish MyoTechnology, Dinamarca), também acoplado a um amplificador e computador com software de integração (Chart v 7.0, PowerLab AD Instruments, Austrália).

## **4.7 - Dosagens e ensaios**

### **4.7.1 - Determinação de nitrato/nitrito sérico (NO<sub>x</sub>)**

As amostras, previamente coletadas e centrifugadas para separação do plasma, foram desproteinizadas com sulfato de zinco diluído 1:1 em água Milli-Q. Para a conversão do nitrato a nitrito as amostras de plasma foram incubadas a 37 °C durante 2 horas em presença da nitrato redutase expressa em *E. coli*. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria. Em seguida, 100 µl do sobrenadante foram misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água Milli-Q) e colocados em placas de 96 poços para leitura a 540 nm em leitor de placas. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente.

### **4.7.2 - Avaliação dos níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona**

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 7,5%) e imediatamente submetidas à centrifugação (3300 rpm por 30 minutos) refrigerada (4 °C). O sobrenadante (2 ml) foi submetido à colunas de passagem contendo 1 ml de etanol e 1 ml de água e acondicionado em tubo siliconizado de baixa retenção (Fisher scientific, Hanover Park, IL, EUA), para que a angiotensina II não ficasse aderida a parede do tubo. Em seguida foi adicionado 500 µl de metanol e levado para centrifugação a vácuo para o isolamento da angiotensina II. A quantificação dos níveis de angiotensina II no plasma foi determinada utilizando kit de imunensaio enzimático comercial

(ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*: Cayman Chemical Company). A aldosterona sérica foi mensurada por teste imunoenzimático (ELISA –: Immuno-Biological Laboratories, Inc) realizado por laboratório de análises clínicas terceirizado.

#### **4.7.3 - Ensaio para quantificação da atividade da ECA**

A atividade da ECA foi determinada utilizando soro obtido a partir dos animais pré-tratados. A metodologia empregada foi a fluorimetria indireta descrita por Santos (SANTOS *et al.* 1985). A atividade da ECA plasmática foi determinada pela quantificação do dipeptídeo L-Histidil-L-Leucina (HIS-LEU) formado após a hidrólise de um substrato tripeptídico sintético, Hispuril-L-Histidil-L-Leucina (Hip-His-Leu) pela ECA plasmática. Ao dipeptídeo His-Leu formado é acoplada uma substância fluorescente, o orto-ftaldialdeído, sendo a fluorescência resultante quantificada em espectrofluorímetro.

O sangue foi coletado em tubos de vidro e a porção plasmática separada por centrifugação (2000 rpm por 15 minutos) e congeladas a 20 °C até a realização do ensaio. Para o teste, 10 µl do plasma foram incubados com 490 µl da solução do ensaio contendo o peptídeo Hip-His-Leu (5 mM) em tampão borato de sódio (0.4 M), pH 8,3 e cloreto de sódio (0,9 M) a 37 °C por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 ml de hidróxido de sódio (NaOH; 0,34 N). O produto His-Leu foi mensurado usando um fluorímetro (365 nm de excitação e 495 nm de emissão – Aminco Model J4-7461 Fluoromonitor, American Instrument Co. Silver Springs, MD, USA) depois da adição de 100 µl de o-ftaldialdeído (20 mg/ml) em metanol. Depois de 10 minutos foi adicionado 200 µl de HCl 3 N e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. A fluorescência intrínseca do plasma foi mensurada no tempo zero em amostras preparadas pela adição de plasma depois do tratamento com NaOH. Todas as leituras para a verificação da atividade da ECA foram feitas em triplicata.

#### 4.7.4 - Western blot

Os animais dos grupos controle ou *high-salt* foram anestesiados com isoflurano por via inalatória e a aorta foi removida e processada seguindo a metodologia descrita por LEAL *et al.* (2002). As artérias aortas foram pulverizadas e transferidas para tubos com tampão de lise (HEPES 10 mM pH de 7,9), contendo: 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de KCl, 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol, 50 mM de NaF, 2 mM de  $Na_3VO_4$  e 10  $\mu g/ml$  de aprotinina), para obtenção do extrato. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 30 min e o sobrenadante separado como a fração citosólica das preparações. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada pelo método de albumina bovina sérica (BSA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Bio-rad laboratories, Inc., Hercules, CA). As amostras obtidas (40  $\mu g$  de proteína por poço) foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante e SDS-poliacrilamida e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno. Após a transferência, a membrana foi bloqueada e posteriormente incubada com anticorpo policlonal para a RhoA (1:500), RhoE (1:250), ROCK1 (1:500), ROCK2 (1:500), AT1 (1:150), AT2 (1:150), MYPT1 (1:500), pMYPT1 (1:500), MLC (1:1000), pMLC (1:800) (1:500), MLCK (1:250), CAM (1:250), CAMKII (1:250), fosfolambam (1:250), STIM1 (1:1000), ORAI (1:1000), IP3 (1:500), RyR (1:500), SERCA2 (1:500) ou SERCA3 (1:500) *over night* (14 a 16 horas) a 4 °C. A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se um kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) e um sistema de aquisição de imagem (FluorChem® HD2 Imaging System, Alpha Innotech Corp., CA, USA). As bandas foram quantificadas por densitometria (utilizando o UN-SCAN-IT gel software, Silk Scientific, Inc. Utah, USA).

#### 4.7.5 - Separação das organelas celulares para ensaio de Western blot

As aortas previamente coletadas foram pulverizadas e transferidas para tubos contendo tampão de lise. Para o preparo do tampão foram utilizados tris-HCl (pH 7,5), EDTA (1 mM), ácido etilenoglicol tretra-acético (EGTA; 1 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (0,5 mM), NaCl (150 mM),  $Na_3VO_4$  (2 mM) e

inibidores de protease (10 µg/ml). Em seguida foram centrifugadas a 3000 g por 30 minutos para extração do núcleo celular. O sobrenadante (porção que contendo membrana e citosol) foi transferido para tubos e centrifugados a 60.000 rpm por 45 minutos (ultracentrifugação). Em seguida, o sobrenadante contendo o citosol foi transferido para outro tubo ao qual foi adicionado ácido acético glacial (pH 4,5) e centrifugado novamente (15000 g por 20 minutos). Após esse processo o sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido com PBS. O *pellet* gerado na ultracentrifugação (porção da membrana celular) foi ressuspendido com tampão RIPA e centrifugado a 15000 g por 20 minutos. O sobrenadante contendo a membrana celular foi retirado. Ambas as porções, citosol e membrana foram utilizadas separadamente para quantificação das proteínas e ensaio do *Western blot*, (para verificar a expressão e translocação da RhoA) conforme descrito no item anterior.

#### **4.8 - Mensuração da liberação de cálcio intracelular em células isoladas de aorta de ratos expostos a dieta *high salt***

Para esse experimento a artéria aorta foi removida, limpa e imersa imediatamente em 10 ml de solução enzimática, contendo collagenase tipo 1 (0.2 mg/ml), elastase tipo 1 (0.075 mg/ml), albumina (1 mg/ml), inibidor de tripsina (0.2 mg/ml) e DL-ditiotreitol (0.2 mg/ml), dissolvidos em PSS com baixa concentração de cálcio (0,16 mM). Os anéis de aorta foram mantidos nessa solução em tubo aerado com oxigênio e aquecimento de 36,5 °C por 40 minutos. Ao final desse período os anéis foram removidos e imersos em 5 ml de outra solução, contendo papaína (1.2 mg/ml), DL-ditiotreitol (0.54 mg/ml) e albumina (4 mg/ml), onde foram mantidos por 30 minutos, sob oxigenação e aquecimento. Em seguida os tecidos foram retirados da solução enzimática e lavados de 5 a 6 vezes com solução nutritiva com baixa concentração de cálcio. Na sequência foram acondicionados em tubo com 2 ml de meio de cultura (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e gentilmente agitado com auxílio de uma pipeta. Após esse procedimento 500 µl da solução foi adicionada a 25 µl de fura 2-acetoximetil ester (Fura 2-AM) (previamente preparada na concentração de 200 µg/ml) e mantida por uma hora em temperatura ambiente, protegida de luz. Para interromper a reação o tubo contendo a preparação foi imerso em recipiente contendo gelo. Em seguida uma

alíquota da suspensão de células (50 µl) foi transferida para a câmara de perfusão (Warner Instrument, Hamden, CT) e mantida por 5 minutos para na aderência das células a lâmina. A câmara foi montada em microscópio de fluorescência invertida (Nikon Diaphot) com filtro para cálcio, devidamente conectado a um computador com software específico para leitura. Durante a mensuração a preparação foi perfundida a uma taxa de 25 µl/minuto. Foi avaliada a diferença (delta) entre a quantidade de cálcio intracelular livre e cálcio ligado durante o estado de repouso, liberação sob estímulo com trifosfato de adenosina (ATP; 100 µM) e a recaptação de cálcio para o retículo endoplasmático. Pelo menos 3 células de cada aorta foram avaliadas para que a leitura fosse considerada válida.

#### **4.9 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *in vivo* E *in vitro***

##### **4.9.1 - Avaliação da pressão arterial sistólica**

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) indireta foi realizada pelo método de *tail cuff* previamente descrito. Para isso, os animais foram transferidos para a sala de experimentação uma hora antes do início dos procedimentos para devida ambientação. Após esse período foram acondicionados em tubos acrílicos de contenção e acomodados sobre placa aquecida, para manter a temperatura corporal. Respeitado um intervalo de 10 minutos para adaptação do animal ao procedimento, o sensor, previamente calibrado, foi colocado na região proximal da cauda, para obtenção dos valores da PAS. Foram realizadas 16 medidas por animal em cada avaliação. A partir da segunda semana de tratamento os animais passaram pela mensuração da pressão arterial semanalmente. Os valores obtidos foram comparados entre os diferentes grupos.

##### **4.9.2 - Avaliação da diurese dos animais *high-salt***

Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas com livre acesso a água durante todo o experimento. Para a realização desse protocolo foi retirada a ração para que os sais presentes na mesma não influenciassem na quantificação de eletrólitos urinários. As coletas de urina foram efetuadas após 1, 2, 4, 6 e 8 horas de acondicionamento. Ao final do experimento foi avaliado o volume, pH e densidade das amostras. As concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram

mensuradas utilizando um fotômetro de chama (Jenway Corp. modelo PFP7). O instrumento foi calibrado com solução padrão contendo diferentes concentrações de sódio e potássio e a leitura das amostras (previamente diluídas em água destilada 1:200) foi feita sob comprimento de onda específica ( $\text{Na}^+$  589 nm e  $\text{K}^+$  768 nm) gerando medidas em mmol/L.

#### **4.9.3 - Investigação da responsividade vascular de animais *high-salt* a agentes vasoconstritores e vasodilatadores *in vivo***

Para verificar a reatividade vascular às drogas vasodilatadoras ou vasoconstritoras *in vivo*, os animais passaram pelo procedimento cirúrgico e introdução dos cateteres conforme descrito no item 4.3 Após período de estabilização da pressão arterial os animais receberam doses de fenilefrina, bradicinina, nitroprussiato de sódio, acetilcolina (3, 10 e 30 nmol/kg) angiotensina I ou angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg) pela via intravenosa. As administrações foram feitas com intervalos de pelo menos 15 minutos entre cada dose, podendo variar de acordo com a droga testada. A ordem de administração também foi alternada para comprovar que o efeito observado era oriundo de cada dose e não da ação cumulativa da droga ou dessensibilização à mesma.

#### **4.9.4 - Relaxamento induzido por acetilcolina e nitroprussiato de sódio**

Depois do procedimento descrito no item 4.6, as preparações foram lavadas e após um novo intervalo para estabilização, as artérias foram contraídas novamente com fenilefrina e, na fase tônica da contração, foram adicionadas concentrações cumulativas de acetilcolina (100 pM a 100  $\mu$ M). Nas artérias mesentéricas testamos também o efeito vasorrelaxante induzido por concentrações cumulativas de nitroprussiato de sódio (1 nM a 100  $\mu$ M). Os resultados obtidos em artérias de animais *high-salt* foram comparados com as respostas mensuradas em vasos provenientes de animais controle (que receberam ração normal).

#### **4.9.5 - Resposta constritora produzida por fenilefrina, angiotensina I e angiotensina II *in vitro***

Após verificação do endotélio e intervalo de uma hora, foi avaliada a resposta dependente da concentração cumulativa de fenilefrina, angiotensina I ou angiotensina II, (todas em concentrações entre 1 nM a 100  $\mu$ M) em anéis de aorta. As artérias mesentéricas também foram expostas às mesmas concentrações de fenilefrina.

#### **4.9.6 - Avaliação do efeito da inibição da via RhoA/ROCK em anéis de aorta e pequenas artérias mesentéricas de animais *high-salt***

Passado o intervalo de estabilização e feita a verificação da integridade do endotélio vascular, os anéis de artéria aorta ou mesentérica foram expostos a concentrações cumulativas de fenilefrina (1 nM a 100  $\mu$ M) na ausência ou na presença do composto Y-27632 (inibidor da ROCK). O inibidor da ROCK foi incubado nas concentrações de 1, 3 ou 10  $\mu$ M na preparações de aorta sem endotélio ( $E^-$ ). Também testamos a concentração de 1  $\mu$ M em anéis de aorta com endotélio ( $E^+$ ) preservado. Nos anéis de pequenas artérias mesentéricas com endotélio o composto Y-27632 foi incubado nas concentrações de 1, 3, 10, 30 ou 50  $\mu$ M. O tempo de incubação em ambos os vasos foi de 15 minutos antes da adição da primeira concentração de fenilefrina. As respostas foram comparadas entre os grupos controle e *high-salt* com e sem o composto Y-27632.

#### **4.9.7 - Avaliação dos efeitos da dieta *high salt* no influxo de cálcio**

Para a avaliação dos efeitos diretos do  $\text{CaCl}_2$ , foi utilizado o protocolo experimental descrito (RATTMANN *et al.* 2005). Inicialmente os tecidos (artérias aorta e mesentéricas) foram contraídos com cloreto de potássio (KCl 120 mM), para determinação da contração máxima dos mesmos. Após 30 minutos foi feita a confirmação da ausência do endotélio vascular. Em seguida, a solução nutritiva PSS foi substituída por Krebs despolarizante sem cálcio (60 mM) e após uma hora os tecidos foram expostos a concentrações cumulativas crescentes de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$  10  $\mu$ M a 100 mM).



#### **4.9.8 - Investigação dos efeitos da dieta *high salt* na mobilização de cálcio intracelular**

Para avaliar a liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático, utilizamos o protocolo experimental descrito por (RATTMANN *et al.* 2005). Após verificar capacidade contrátil dos tecidos em resposta à alta concentração de cloreto de potássio (KCl 120 mM), foi confirmada a ausência do endotélio vascular. Passados 45 minutos a solução nutritiva de Krebs foi substituída por Krebs sem cálcio com EGTA. Depois de 15 minutos foi adicionado fenilefrina (1  $\mu$ M) ou cafeína (1 mM – aorta; 20 mM - mesentérica) e observada a resposta máxima do tecido. O mesmo protocolo foi repetido na presença de tapsigargina (1  $\mu$ M, previamente incubada por 15 minutos), um inibidor da recaptação de cálcio para o retículo endoplasmático através da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. A análise foi feita comparando a contração obtida em artérias oriundas de ratos controle com a resposta contrátil obtida de animais *high salt*.

#### **4.10 - Análise dos resultados e testes estatísticos**

Os dados foram apresentados de acordo com o programa GraphPad Prism 5.00. Os resultados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão das médias de 6 a 8 experimentos. A análise estatística dos resultados para a comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) ou análise da variância de duas vias seguidas pelo teste *t* de Bonferroni. Quando necessário foi feita a análise estatística utilizando o teste *t* student.

## V – RESULTADOS

### 5.1 - Ausência de efeito da dieta com altas concentrações de cloreto de sódio na pressão arterial de ratos anestesiados e acordados

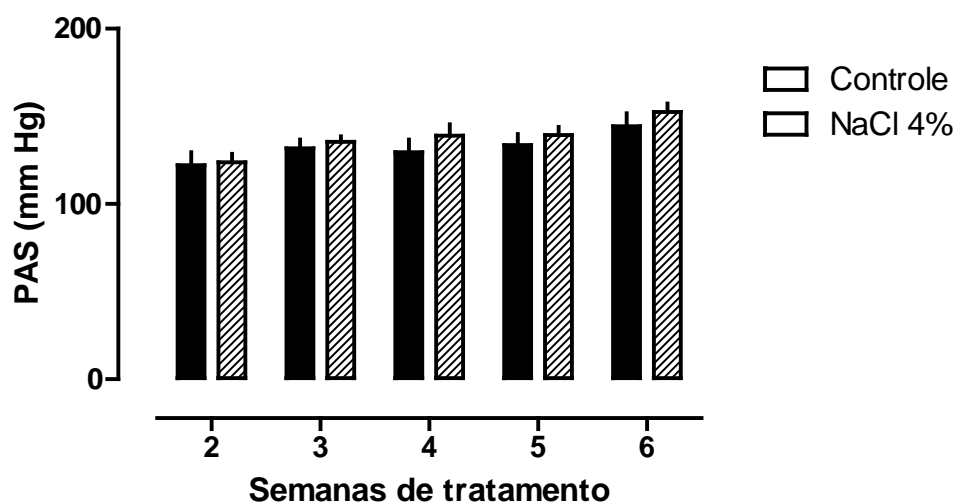
A pressão arterial média (PAM) registrada, sob anestesia, em animais do grupo controle (depois de 20 minutos de estabilização e antes da administração de qualquer droga) foi  $82.4 \pm 4.2$  mm Hg. Não foram encontradas diferenças na PAM dos grupos expostos a dieta *high salt* (2, 4 e 8%). De modo semelhante, a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) se mantiveram sem alterações, assim como a frequência cardíaca (Tabela 3).

**Tabela 3 – Pressão arterial e frequência cardíaca de ratos anestesiados previamente expostos à dieta *high salt* ou padrão.**

Grupo	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	PAM (mm Hg)	Frequência (bpm)
Controle	$101,3 \pm 4,0$	$68,4 \pm 4,8$	$82,4 \pm 4,2$	$227,1 \pm 21,7$
NaCl 2%	$94,8 \pm 3,9$	$58,5 \pm 3,9$	$73,6 \pm 3,5$	$203,7 \pm 15,5$
NaCl 4%	$101,9 \pm 1,9$	$63,2 \pm 3,5$	$78,3 \pm 2,6$	$220,4 \pm 10,7$
NaCl 8%	$107,2 \pm 3,4$	$63,5 \pm 5$	$80,5 \pm 4,6$	$202,0 \pm 18,3$

Os valores referem-se aos dados obtidos antes da administração de drogas. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 10 animais cada grupo.

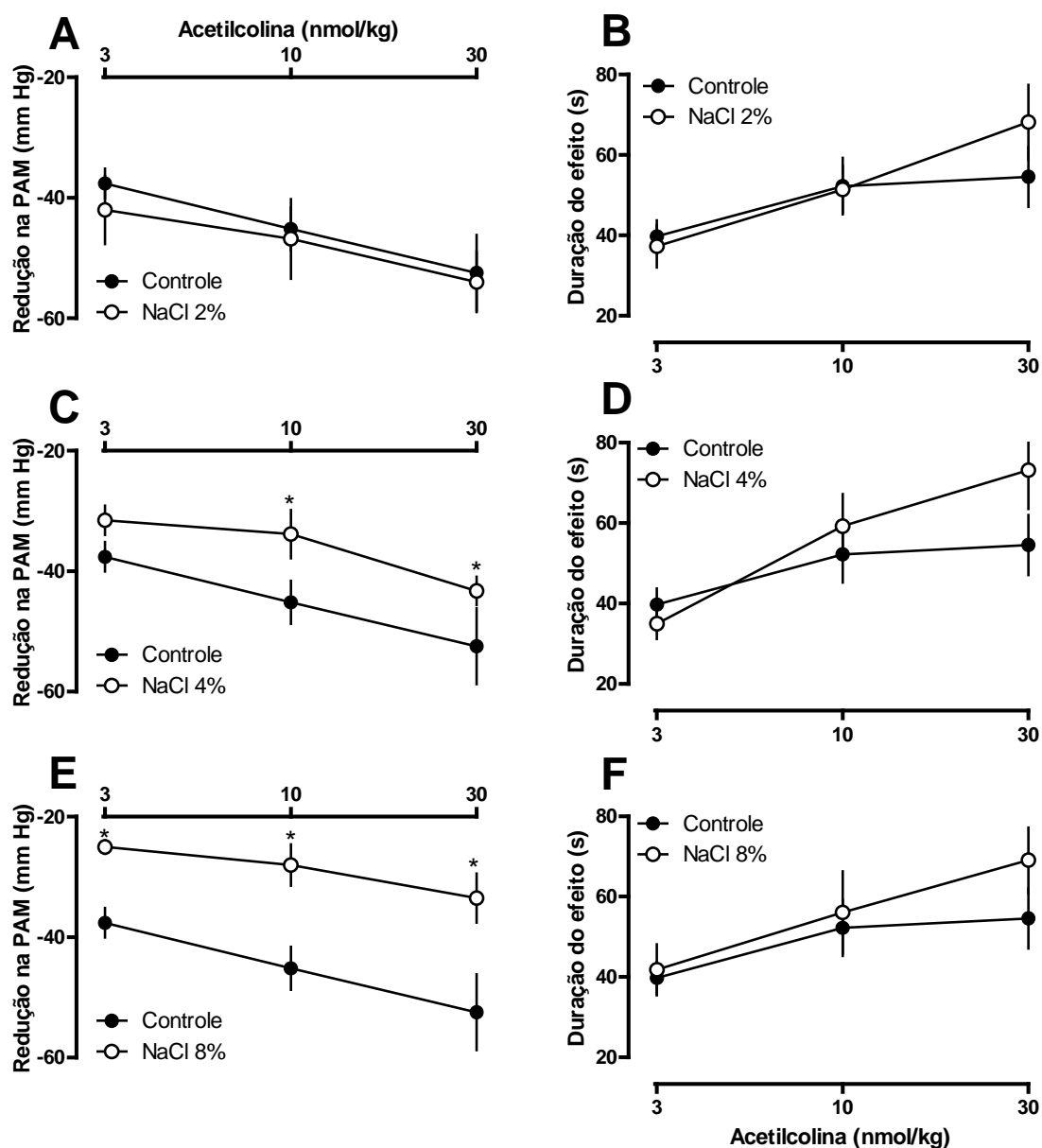
Através do método indireto (pressão de cauda) foi verificada a PAS dos grupos (controle e NaCl 4%) semanalmente e ambos apresentaram níveis basais semelhantes (Figura 2).



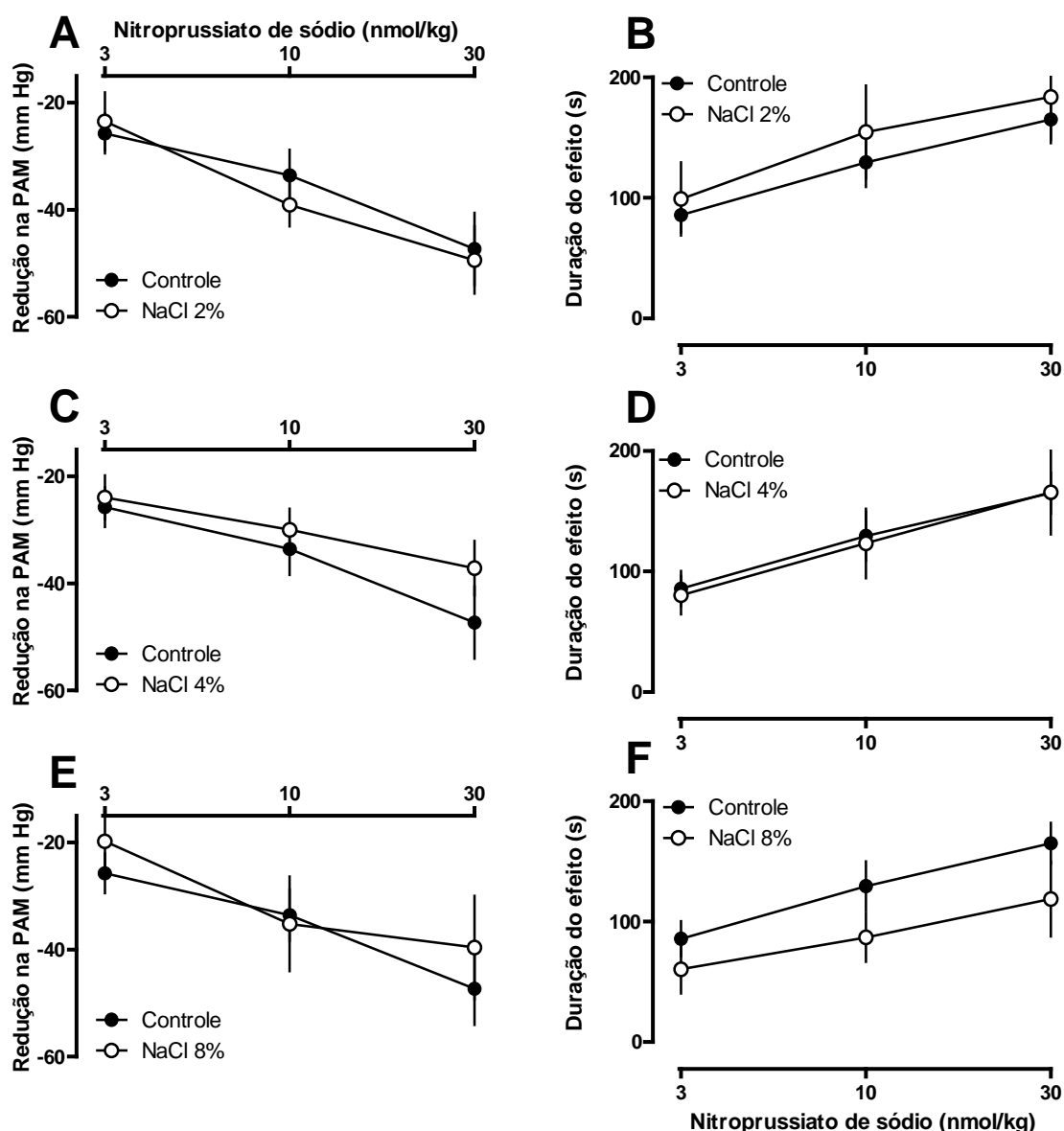
**Figura 2: Avaliação semanal da pressão arterial sistólica em animais acordados.** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 15 animais por grupo. A análise estatística entre os grupos foi realizada através da Análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

## 5.2 - Responsividade à acetilcolina e nitroprussiato de sódio, *in vivo*, induzida por dieta hipersódica

Apesar da dieta enriquecida com cloreto de sódio não ter induzido hipertensão em nenhum dos grupos, buscamos investigar se a responsividade a agentes vasodilatadores poderia estar alterada. O efeito vasodilatador induzido pela acetilcolina (ACh) foi diminuído nos animais expostos a dieta NaCl 4 e 8%. A ACh na dose de 10 nmol/kg reduziu a PAM em  $45,2 \pm 3,5$  mm Hg nos animais controle (Figura 3A). Enquanto ratos expostos a dieta NaCl 4 e 8% tiveram resposta hipotensora de  $33,8 \pm 4,0$  e  $28,0 \pm 0,9$  mm Hg, respectivamente (Figura 3C e 3E). Apesar destes resultados a duração do efeito induzido ACh não foi alterada (Figura 3B, D e F). O doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, causou efeitos semelhantes em todos os grupos (Figura 4).



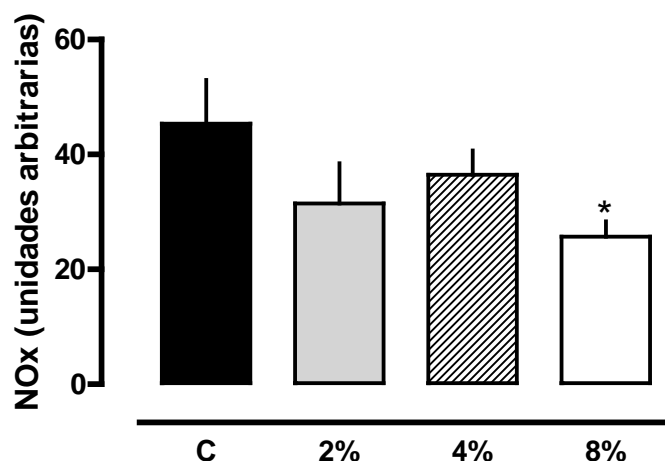
**Figura 3: Redução do efeito da acetilcolina na pressão arterial média de ratos *high salt* anestesiados.** Alterações produzidas na PAM de ratos dos grupos controle, NaCl 2% (A), NaCl 4% (C) e NaCl 8% (E) pela acetilcolina (3, 10 e 30 nmol/kg i.v.). Os painéis B, D e F representam o tempo que a pressão arterial levou para retornar aos níveis basais nos mesmos grupos experimentais citados. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada usando o Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 4: Ausência de alterações no efeito hipotensor do nitroprussiato de sódio em ratos anestesiados submetidos à dieta *high salt*.** Alterações produzidas na PAM (mm Hg) de ratos controle, NaCl 2% (**A**), NaCl 4% (**C**) e NaCl 8% (**E**) com a administração intravenosa de nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/kg). Os painéis **B**, **D** e **F** representam o tempo que a pressão arterial levou para retornar aos níveis basais nos mesmos grupos experimentais citados. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de experimentos realizados com 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi feita através ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram encontradas diferenças estatísticas.

### 5.3 - Ratos expostos à dieta high salt tem redução de nitrito/nitrato sérico (NOx)

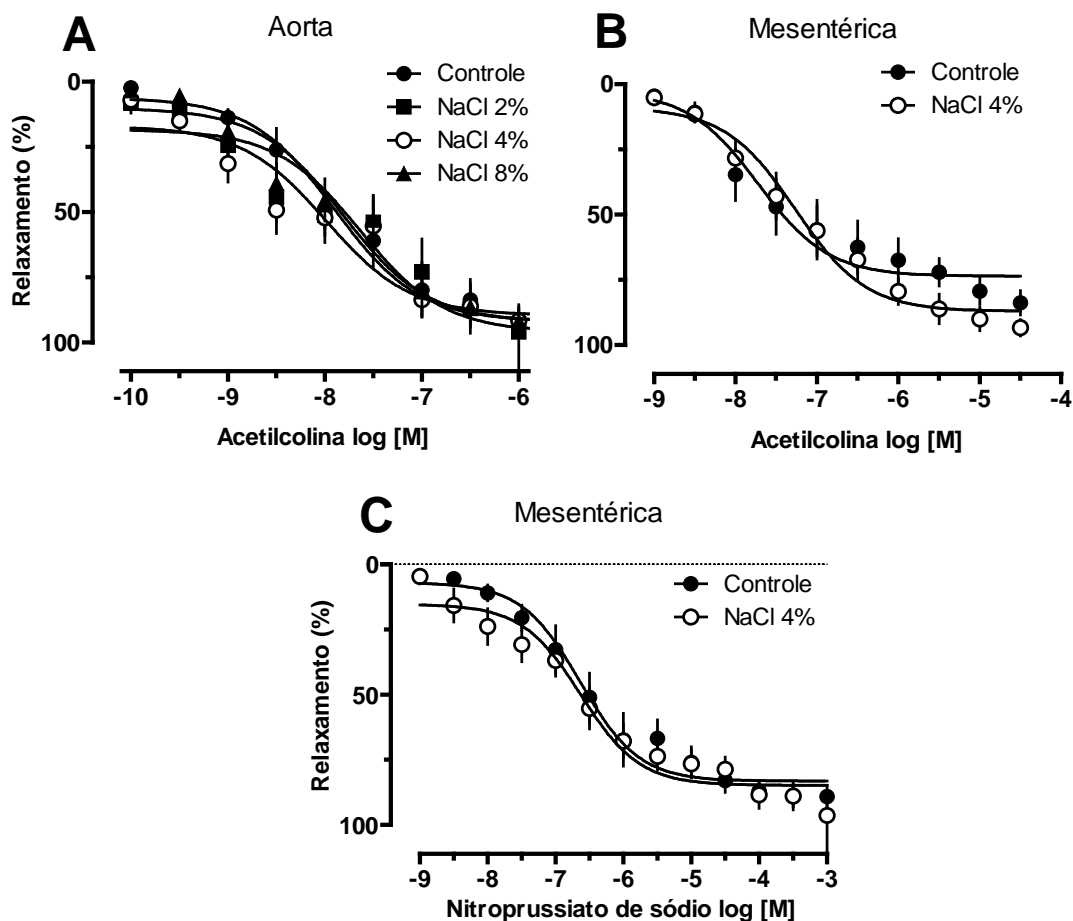
A análise dos níveis de NOx revelou uma redução nos níveis de nitrito/nitrato no plasma de ratos do grupo NaCl 8%. O soro oriundo de animais dos grupos NaCl 2% e 4% não teve alteração na quantidade de NOx (Figura 5).



**Figura 5: Níveis de NOx sérico em animais expostos a dieta *high salt*.** Os níveis de nitrito/nitrato (NOx) foram mensurados em amostras coletadas dos grupos controle, NaCl 2, 4 e 8%. A letra C representa o grupo controle. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média de 10 animais de cada grupo. A análise estatística foi feita usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao respectivo grupo controle.

### 5.4 - Responsividade das artérias aorta e mesentérica à ACh e ao nitroprussiato de sódio

Devido aos resultados anteriores, avaliamos se a hiporesponsividade à ACh também ocorre em vasos isolados. Porém, o efeito vasorrelaxante induzido por este agonista muscarínico não foi modificado nos anéis de vasos de condutância – aorta (Figura 6A) e nem nos vasos de resistência – mesentérica (Figura 6B). Da mesma forma, a ação do nitroprussiato de sódio nas artérias mesentéricas se manteve inalterada (Figura 6C).

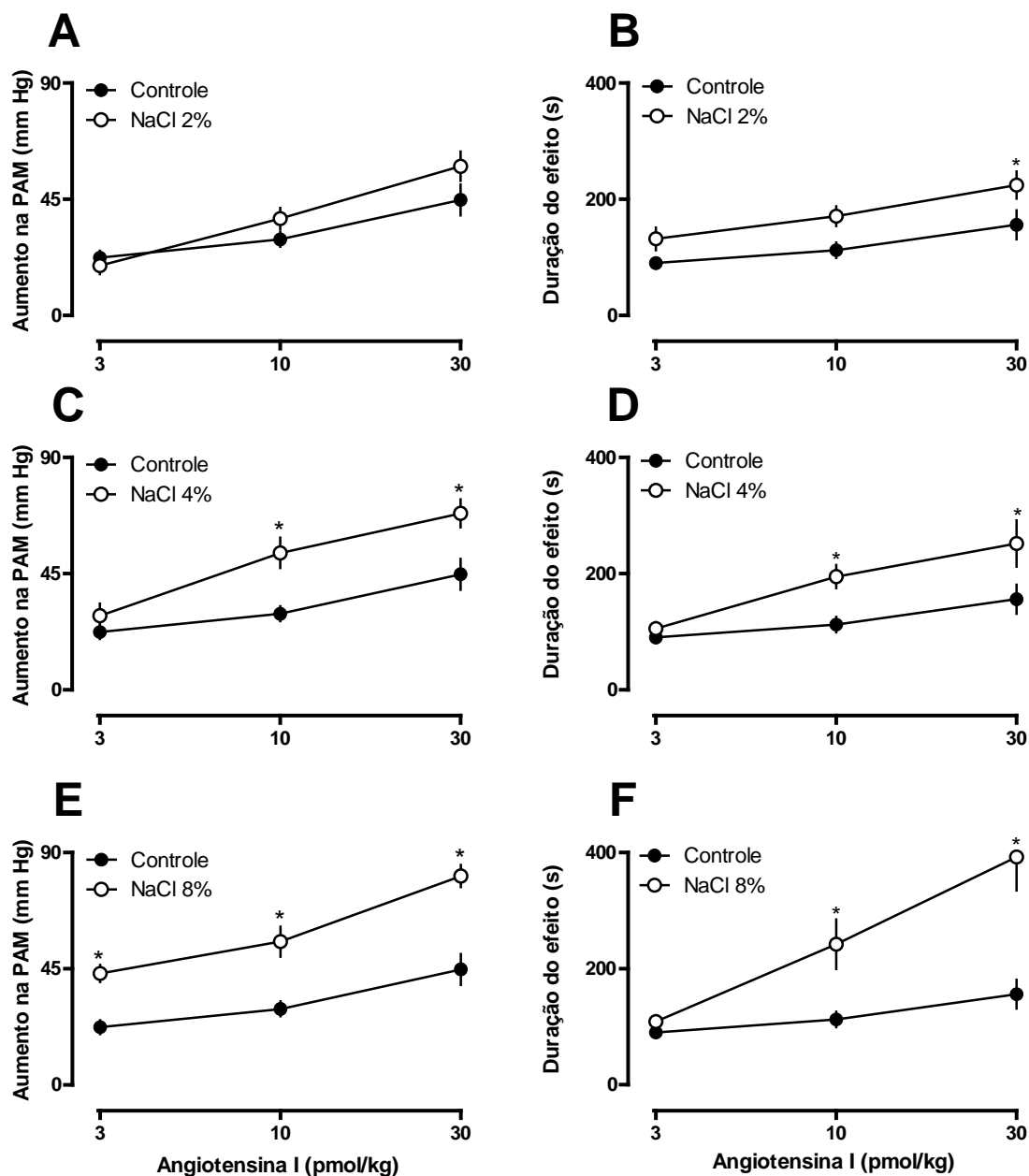


**Figura 6: Relaxamento induzido pela administração cumulativa de acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em anéis de artérias aorta ou pequenas artérias mesentéricas.** Curva concentração-resposta para acetilcolina em artéria aorta de ratos controle, NaCl 2, 4 e 8% **(A)**. Relaxamento induzido pela acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos controle e NaCl 4% **(B)**. Curva concentração resposta induzida por nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas **(C)**. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de vasos de 6 animais por grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram encontradas diferenças estatísticas.

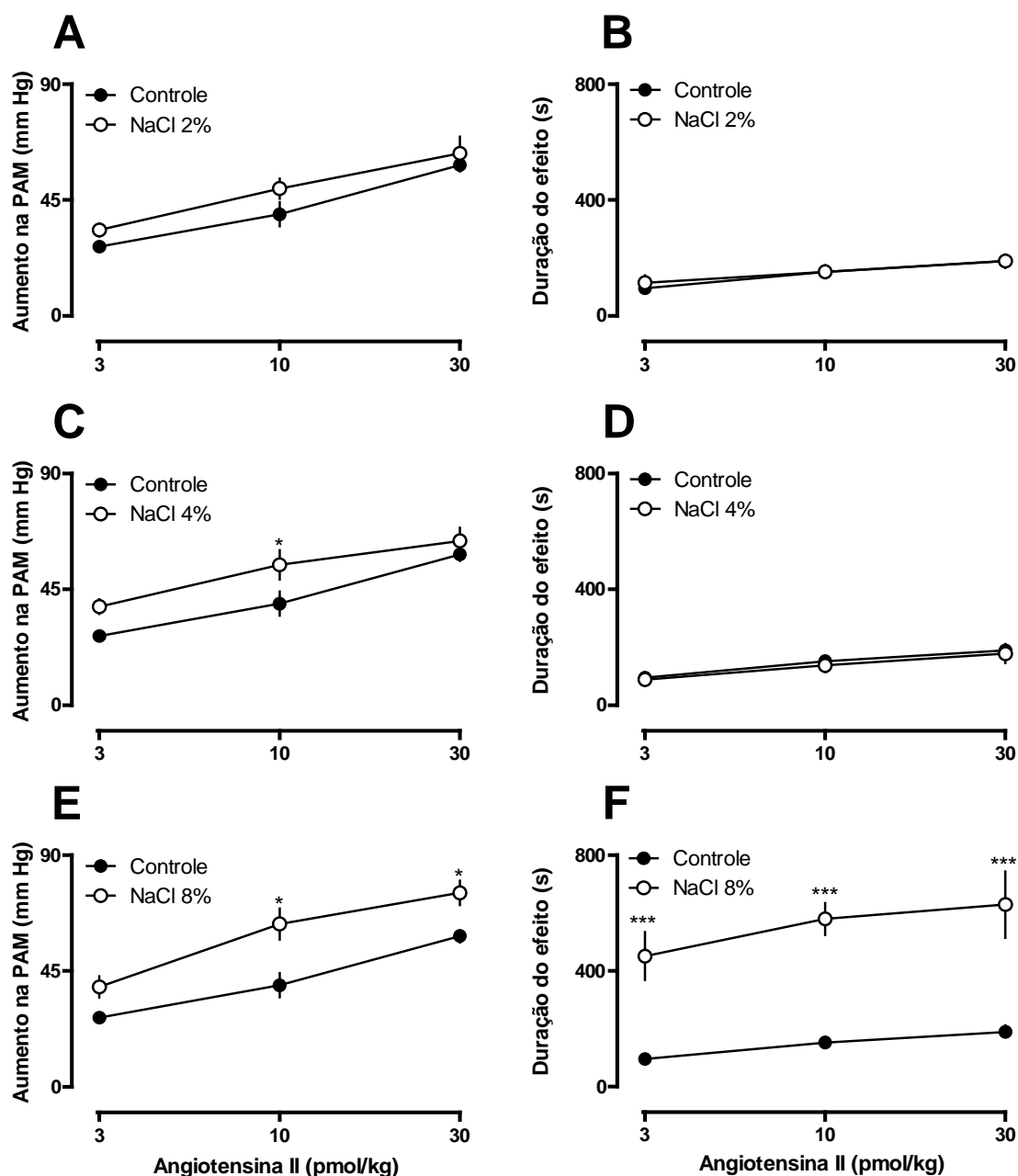
### **5.5 - Aumento da responsividade à angiotensina I e II em ratos expostos à dieta *high salt***

A administração de angiotensina I elevou a PAM dos animais de forma dependente da dose que não foi alterado no grupo NaCl 2%, mas aumentou em animais que receberam ração com NaCl 4 e 8% (Figuras 7A, D e E). Por exemplo, a dose intermediária de angiotensina I utilizada em nossos experimentos (10 pmol/kg) elevou a PAM em  $53,1 \pm 5,8$  e  $55,5 \pm 5,8$  mm Hg nos animais tratados com NaCl 4 e 8% e  $29,5 \pm 2,8$  mm Hg no grupo controle. Embora ratos submetidos à dieta contendo NaCl 2% não tenham apresentado alteração de resposta para a angiotensina II (Figura 8A), encontramos aumento de responsividade para esse peptídeo nos animais expostos à dieta NaCl 4 e 8% (Figuras 8C e E). Por exemplo, a angiotensina II, na dose de 10 pmol/kg elevou a PAM em  $39,5 \pm 4,7$  mm Hg no grupo controle e  $54,6 \pm 5,7$  e  $63,3 \pm 6,9$  mm Hg nos ratos dos grupos NaCl 4 e 8%, respectivamente. Os tempos de resposta para a angiotensina I (Figuras 7C e F) e angiotensina II (Figura 8F) também foram prolongados em ratos expostos à dieta *high salt* (grupos NaCl 4 e 8% para angiotensina I e grupo NaCl 8% para angiotensina II).





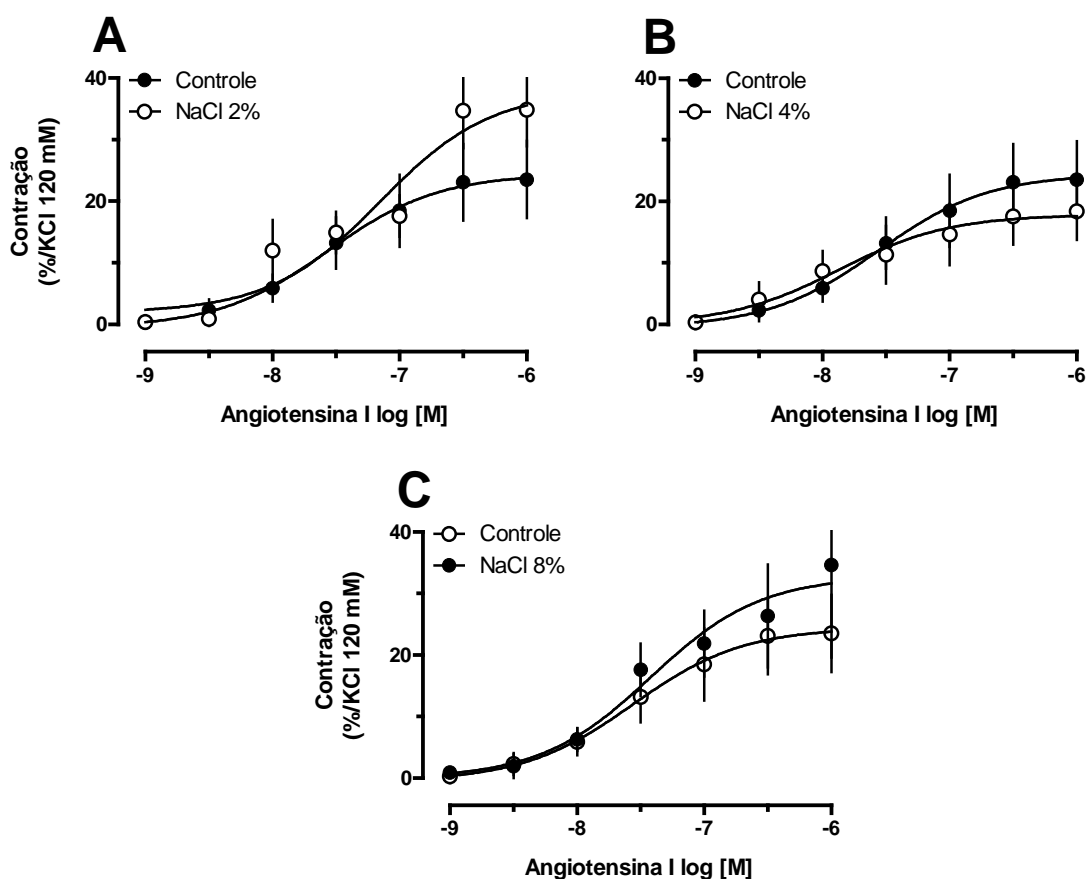
**Figura 7: Aumento dos efeitos hipertensivos da angiotensina I em ratos normotensos jovens, expostos à dieta *high salt*.** Aumento da PAM (A, C e E) e duração do efeito (B, D e F) induzido pela angiotensina I (3, 10 e 30 pmol/kg, i.v. *in bolus*) em ratos controle ou expostos a dieta *high salt* (2, 4 e 8%) anestesiados previamente. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6-7$ ). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em quando comparado com o grupo controle.



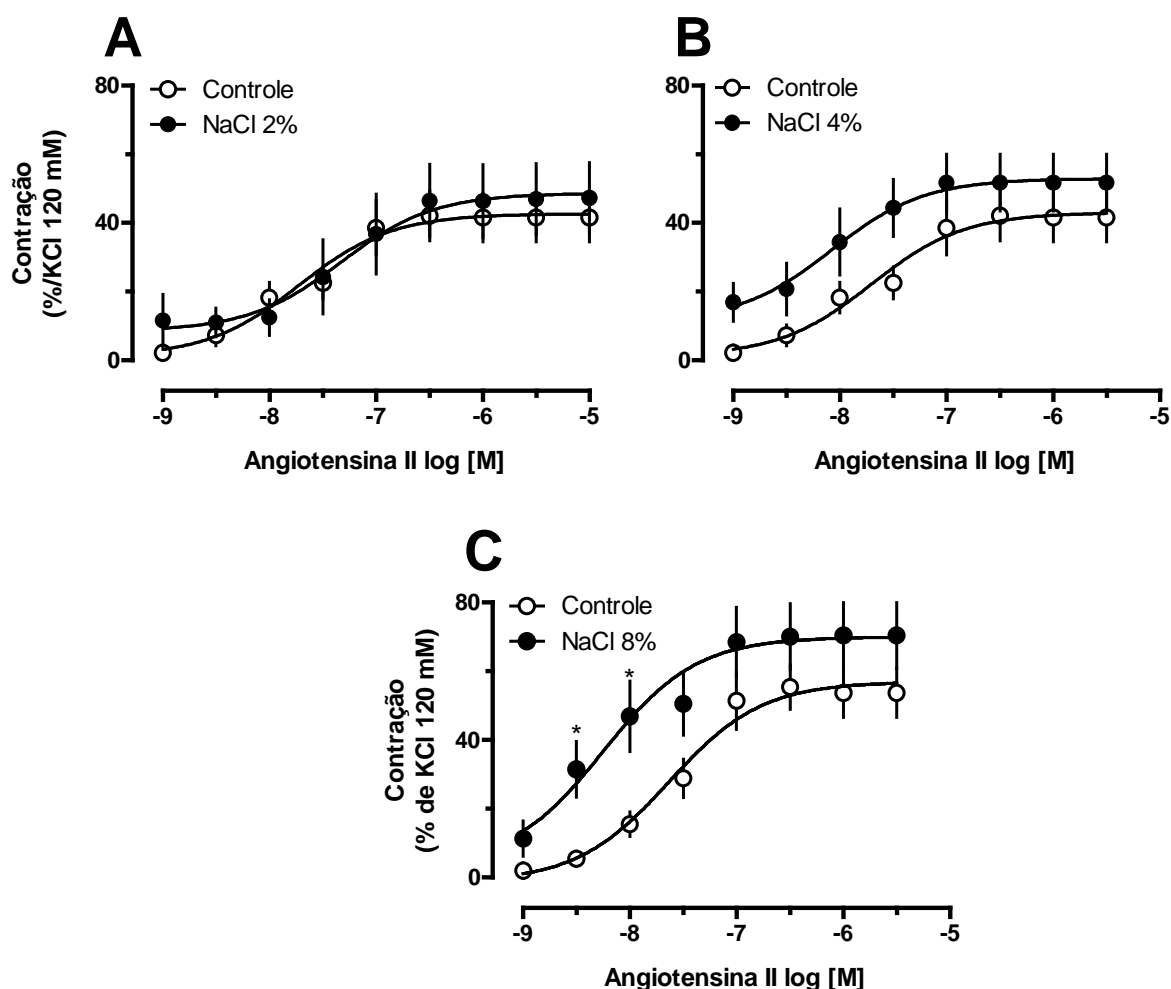
**Figura 8: Aumento da resposta pressórica induzida pela angiotensina II em ratos normotensos jovens expostos à dieta *high salt*.** Aumento da PAM (A, C e E) e da duração do efeito (B, D e F) induzido pela angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg, i.v.). Os efeitos foram mensurados em ratos anestesiados após 6 semanas de exposição à dieta com altas concentrações de NaCl ou controle. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais cada grupo. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.

### 5.6 - Efeito *in vitro* da angiotensina I e II em artérias aorta isoladas de ratos

Em virtude dos resultados obtidos com angiotensina I e II *in vivo*, se tornou importante avaliar a responsividade a esses peptídeos *in vitro*. Em anéis de aorta isolados de ratos *high salt* a angiotensina I induziu resposta vasoconstritora semelhante nos anéis de aorta de todos os grupos experimentais (Figuras 9A, B e C). Entretanto, a angiotensina II causou um deslocamento da curva de contração para a esquerda, sem aumento da resposta máxima em anéis de aorta oriundo de ratos NaCl 8% (Figura 10C). A responsividade para angiotensina I e II nos vasos de resistência não foi alterada em nenhum dos grupos testados (dados não mostrados).



**Figura 9: Contração induzida pela adição cumulativa de angiotensina I em artérias aorta.** Curva concentração-resposta para angiotensina I em artéria aorta isoladas de ratos normotensos tratados com dieta padrão (controle) ou com concentrações de 2% (A) 4% (B) e 8% (C). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 animais por grupo. A análise estatística foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

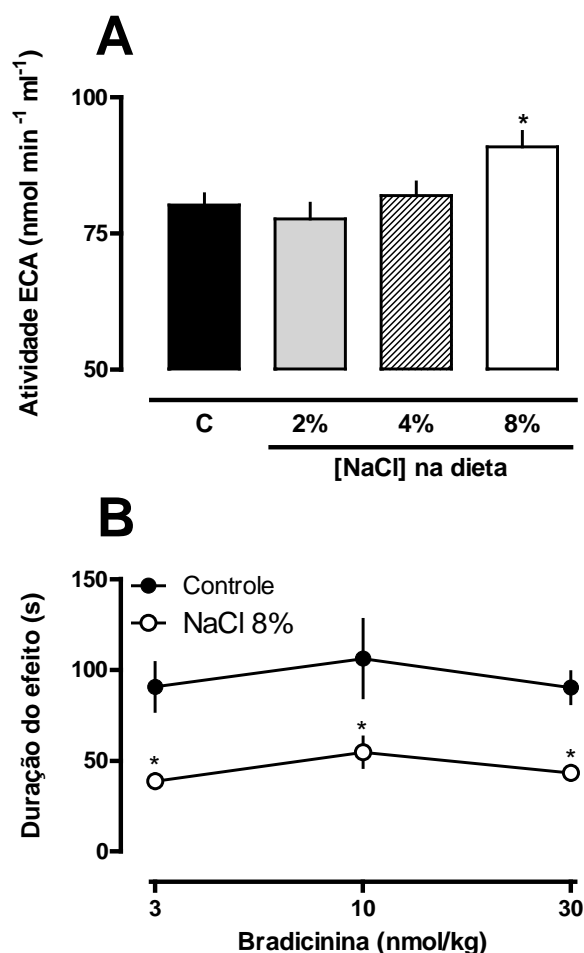


**Figura 10: Efeito da adição cumulativa de angiotensina II artérias aortas isoladas.** Curva concentração-resposta para angiotensina II em artérias aortas isoladas de ratos controle ou tratados com dieta *high salt* 2% (A), 4% (B) e 8% (C). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média de 5-7 animais por grupo. A comparação estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.7 - Ratos expostos a dieta *high salt* 8% tem maior atividade da ECA plasmática

O aumento da responsividade para angiotensina I *in vivo* nos levou a testar a atividade da ECA. A análise quantitativa revelou um aumento significativo na atividade de ECA plasmática (aproximadamente 15%) no plasma do grupo NaCl 8% (mas não nos grupos NaCl 2 e 4%) quando comparada ao grupo controle (Figura 11A). Essa atividade *ex vivo* foi confirmada *in vivo* pela redução do tempo

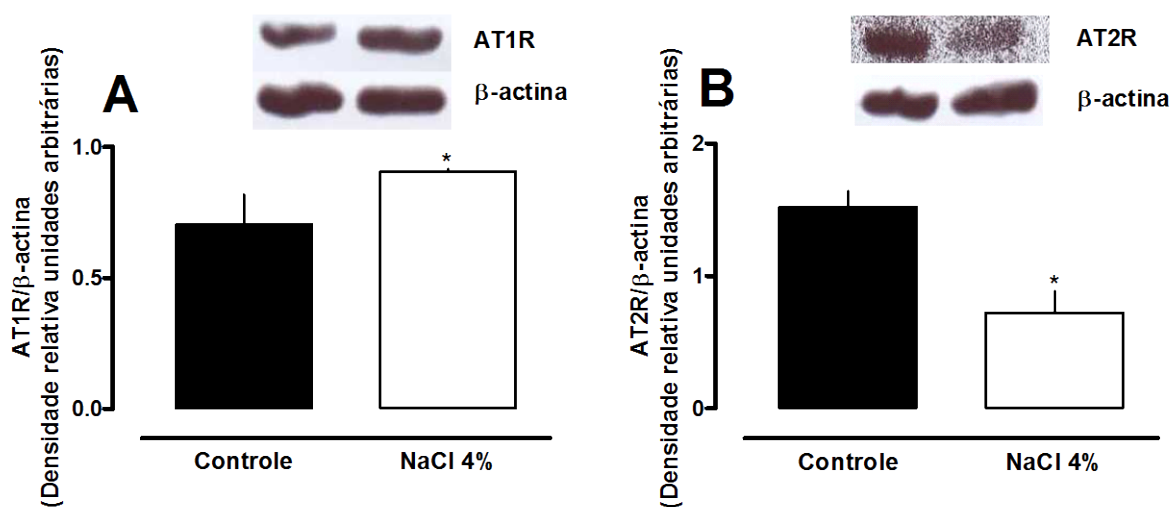
de resposta hipotensora da bradicinina em ratos do grupo NaCl 8% (Figura 11B), sem alterar o efeito hipotensor (dados não mostrados). Os animais pertencentes ao grupo NaCl 2 e 4% não apresentaram alteração no efeito da bradicinina.



**Figura 11: Aumento da atividade da ECA plasmática e redução do efeito hipotensor da bradicinina em ratos normotensos jovens expostos à dieta *high salt*.** Atividade plasmática da ECA (**A**) mensurada em amostras coletadas dos grupos controle, NaCl 2, 4 e 8%. A letra C representa o grupo controle. Duração do efeito hipotensor induzido pela bradicinina (3, 10 e 30 nmol/kg), administrada intravenosamente, em ratos controle e expostos a dieta *high salt* 8% (**B**). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 animais por grupo. A análise estatística foi feita usando ANOVA de uma via (A) ou ANOVA de duas vias (B), seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao respectivo grupo controle.

### 5.8 - Aumento da expressão dos receptores AT1 AT2 de angiotensina II

Os dados obtidos nos experimentos descritos até o momento nos levaram à hipótese de que poderia haver uma mudança na densidade de expressão dos receptores de angiotensina II. Através do ensaio de *Western blot* observamos que aortas de ratos expostos à dieta hipersódica (NaCl 4%) tiveram um aumento na expressão de receptores AT1 de cerca de 29% (Figura 12A), acompanhado de redução de aproximadamente 50% na expressão de receptores AT2 (Figura 12B).

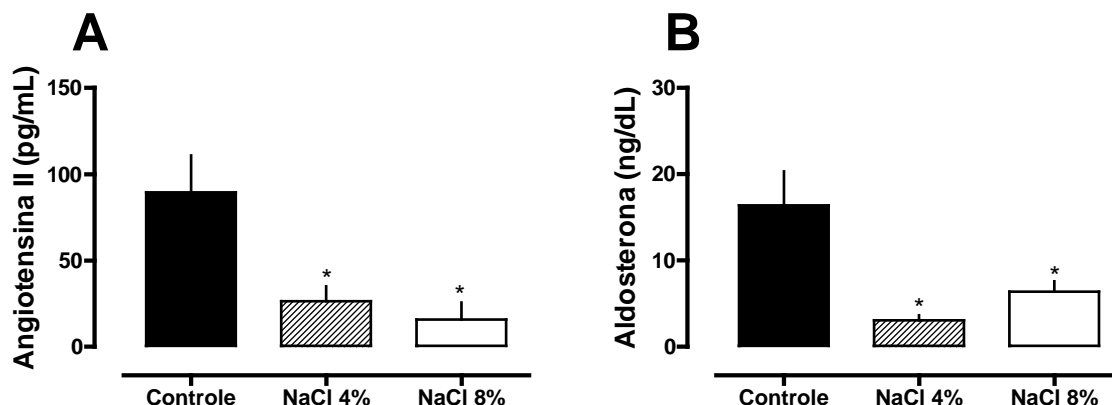


**Figura 12: Alteração da expressão dos receptores AT1 e AT2 para angiotensina II em aorta de ratos tratados com dieta *high salt*.** Expressão de receptores AT1 (**A**) e AT2 (**B**) para angiotensina II na aorta isolada de ratos controle e NaCl 4% mensurada pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela β-actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 5 amostras por grupo obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando o teste *t student*. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.9 - Redução nos níveis de angiotensina II e aldosterona no plasma de ratos expostos a dieta *high salt*

As alterações de resposta *in vivo* e/ou *in vitro* demonstradas anteriormente geraram a hipótese de que os níveis plasmáticos dos constituintes da via RAAS poderiam estar alterados. Por isso mensuramos as quantidades de angiotensina II e aldosterona. Observamos uma redução nas quantidades de ambos, angiotensina II e aldosterona, em amostras de plasma oriundas de animais expostos a ração contendo NaCl 4 e 8%. Os níveis de angiotensina II ( $89,3 \pm 21,4$

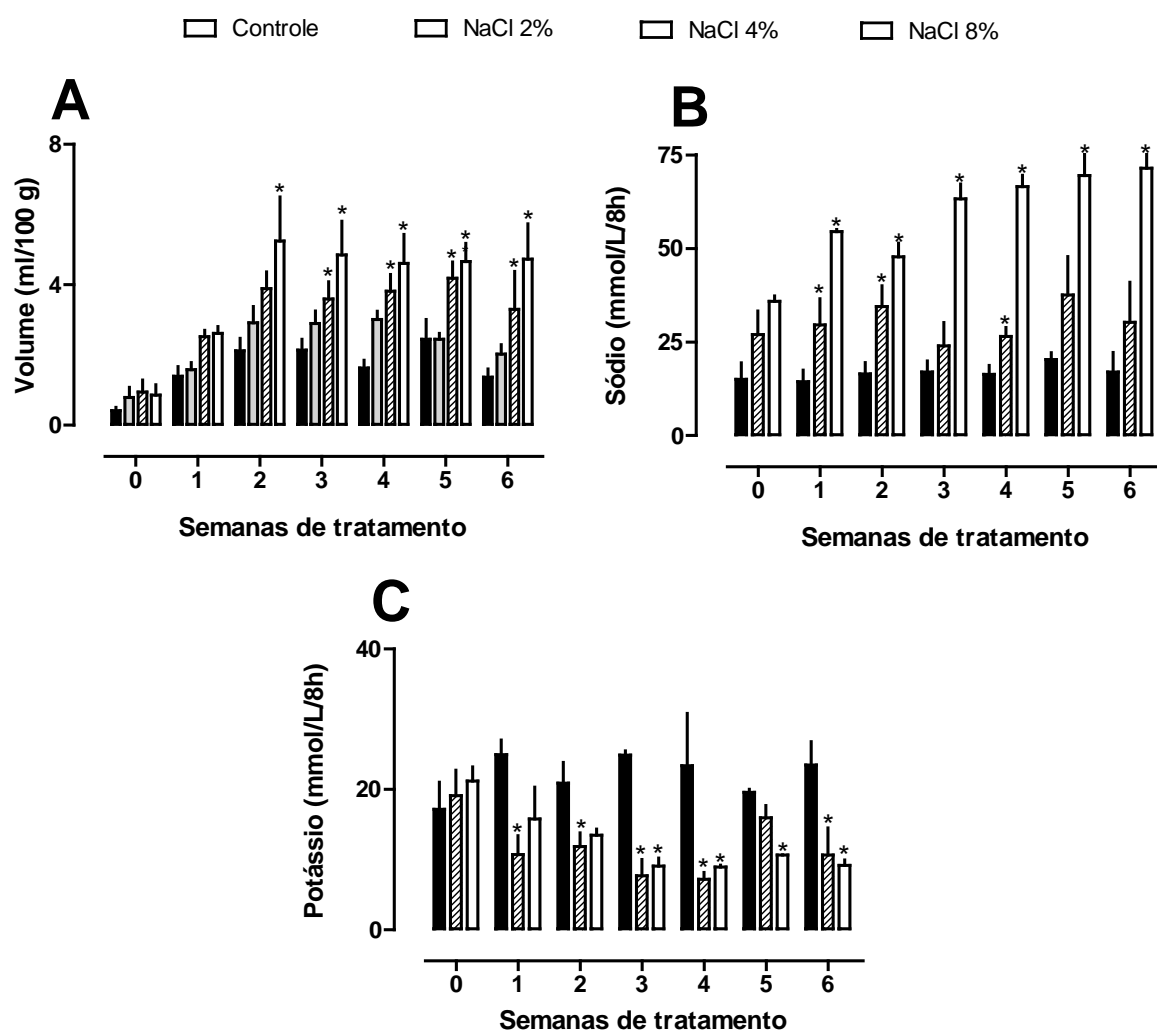
pg/ml, no grupo controle) foram reduzidos em cerca de 70 e 80% no plasma de animais dos grupos NaCl 4 e 8%, respectivamente (Figura 13A). Do mesmo modo, os níveis de aldosterona ( $16,4 \pm 4,0$  ng/ml, nos ratos controle) tiveram redução de 80 e 60% nos ratos NaCl 4 e 8%, respectivamente (Figura 13B).



**Figura 13: Redução dos níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona em ratos normotensos jovens expostos à dieta *high salt*.** A angiotensina II (A) e a aldosterona (B) foram mensuradas em amostras coletadas de ratos expostos a dieta normal (Controle) ou *high salt* (4 e 8%). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5-7$ ). A análise estatística foi feita por meio de ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

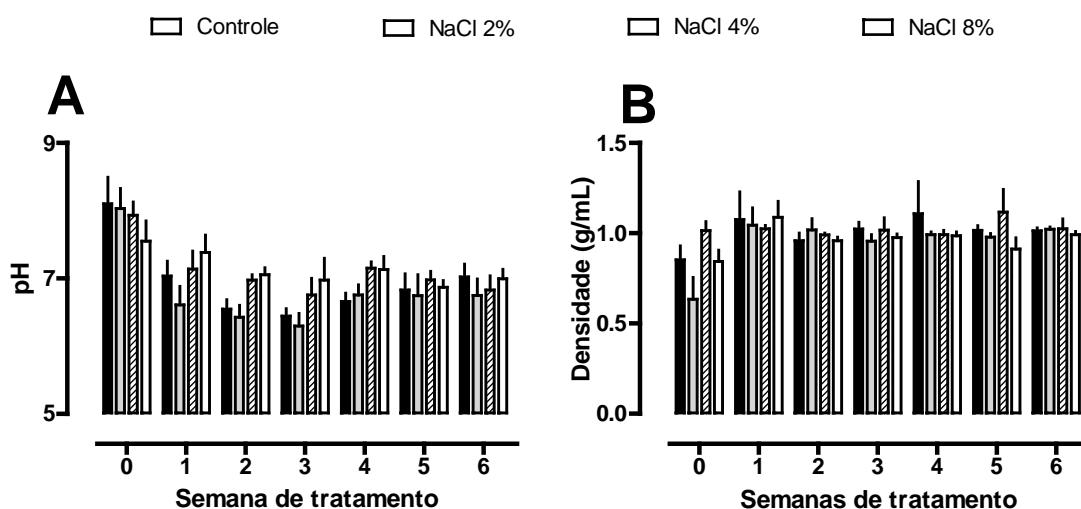
#### 5.10 - Efeito natriurético aumentado em ratos expostos à dieta *high salt*

As observações de alteração do volume de urina durante a manipulação diária dos animais associada com a alteração nos níveis de aldosterona nos levaram à avaliação de parâmetros diuréticos. Ratos expostos à dieta *high salt* (grupos 4 e 8%) tiveram o volume urinário total aumentado (entre 30 e 150%) em todas as semanas de tratamento. Entretanto, a partir da terceira semana a diferença de volume excretado foi mais expressiva (Figura 14A). De modo semelhante estes animais apresentaram aumento nos níveis de sódio excretados, especialmente no grupo NaCl 8% (Figura 14B). Por outro lado, os níveis de potássio foram reduzidos de modo proporcional à dieta, sendo mais expressivo nos animais expostos à dieta *high salt* 8% (Figura 14C). O pH (Figura 15A) e a densidade (Figura 15B) urinária permaneceram inalterados em todas as análises.



**Figura 14: Aumento da diurese e natriurese e redução da excreção de potássio em ratos normotensos jovens submetidos à dieta *high salt*.** Volume urinário (A) quantidade de sódio (B) e potássio (A), excretado por ratos do grupo controle ou submetidos ao tratamento com dieta *high salt* por 6 semanas. As análises foram feitas utilizando o acumulado de urina coletado durante 8 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6-9$ ). A análise estatística foi feita usando ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

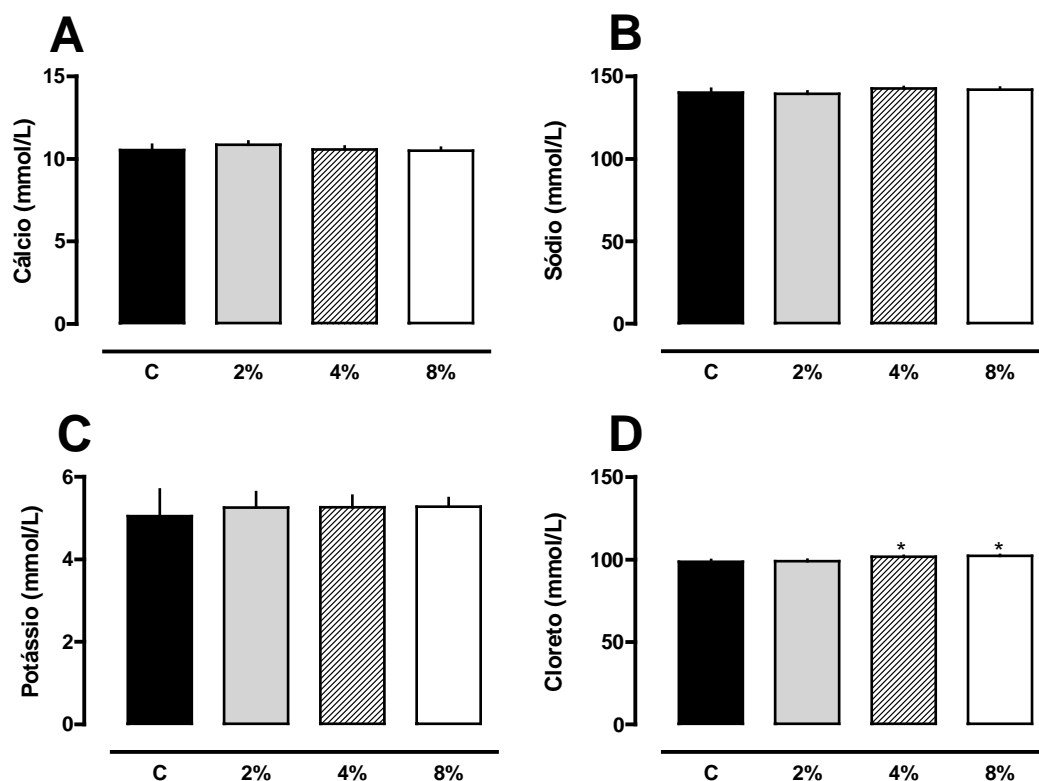




**Figura 15: Ausência de efeito da dieta *high salt* na densidade e pH da urina acumulada.** A análise do pH (A) e densidade (B) foram feitos em urina fresca, oriunda dos animais controle ou expostos a dieta *high salt* (NaCl 2, 4 e 8%). As coletas foram realizadas a cada semana de tratamento. O tempo zero indica o período antes da exposição a dieta com altas concentrações de NaCl. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6 - 9$ ). A análise estatística foi feita usando ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

### 5.11 - Níveis de eletrólitos no plasma de ratos expostos à dieta *high salt*

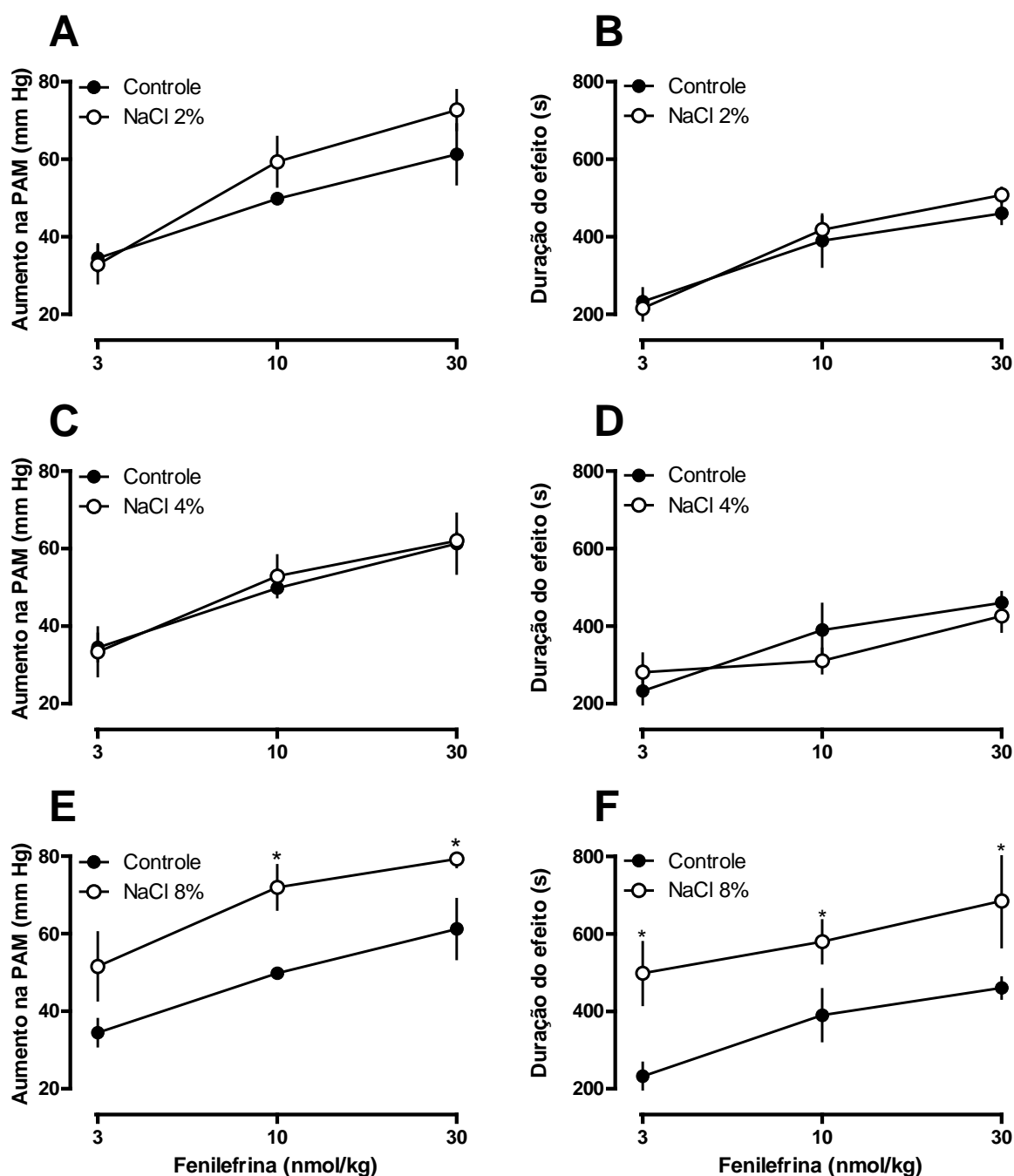
Os animais dos grupos controle ou tratados com a dieta *high salt* 2% não apresentaram alterações nos níveis plasmáticos de cálcio (Figura 16A), sódio (Figura 16B) e potássio (Figura 16C). Entretanto, o plasma de ratos expostos a dieta *high salt* (grupos 4 e 8%) tiveram aumento nos níveis de cloreto (entre 3 e 4%) em relação ao grupo controle (Figura 16D).



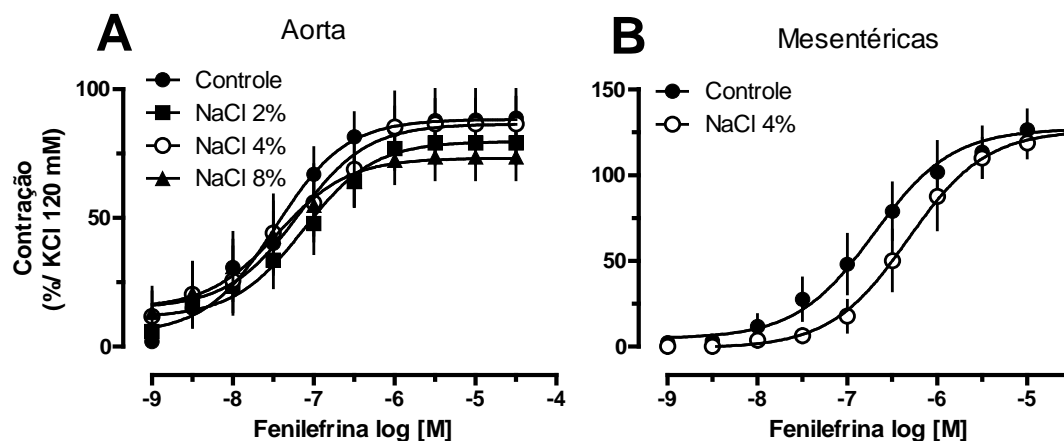
**Figura 16: Níveis de eletrólitos no plasma de ratos expostos à dieta *high salt*.** O cálcio (A), sódio (B), potássio (C) e cloreto (D) foram mensurados em amostras coletadas de ratos expostos a dieta normal (controle) ou *high salt* (2, 4 e 8%). A letra C representa o grupo controle. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6 - 9$ ). A análise estatística foi feita usando ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.12 - Responsividade à fenilefrina *in vivo* e *in vitro*

A administração de fenilefrina causou efeito dependente da dose, o qual não foi alterado no grupo NaCl 2 e 4%, mas aumentou em animais que receberam ração com NaCl 8% (Figuras 17A, C e E). A dose de 10 pmol/kg usada em nossos experimentos elevou a PAM em  $72,0 \pm 5,7$  mm Hg nos animais tratados com NaCl 8% e  $49,8 \pm 1,6$  mm Hg no grupo controle. O tempo de resposta para fenilefrina também foi aumentado em ratos expostos à dieta hipersódica NaCl 8% (Figura 17F). Entretanto, nos experimentos *in vitro*, a vasoconstrição causada pela fenilefrina foi semelhante entre todos os grupos testados, tanto em aorta (Figura 18A) como em pequenas artérias mesentéricas (Figura 18B).



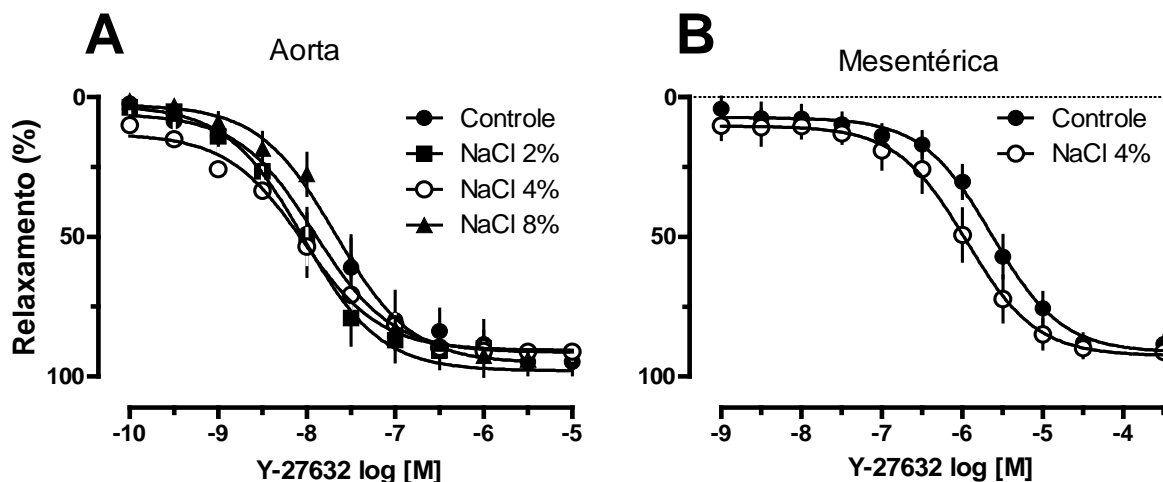
**Figura 17: Aumento da resposta pressórica induzida pela fenilefrina em ratos normotensos jovens expostos à dieta *high salt*.** Aumento da PAM (A, C e E) e duração do efeito (B, D e F) induzido pela fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg, i.v.). Os efeitos foram mensurados em ratos anestesiados após 6 semanas de exposição à dieta com altas concentrações de NaCl. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais em cada grupo. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 18: Contração induzida pela adição cumulativa de fenilefrina em artérias aorta e mesentéricas.** Curva cumulativa dependente da concentração para fenilefrina em artéria aorta **(A)** e mesentérica **(B)** isoladas de ratos normotensos tratados com dieta padrão (controle), ou com concentrações modificadas de NaCl. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de vasos oriundos de 6-8 animais por grupo. A análise estatística foi feita com o auxílio do teste de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

### 5.13 - Responsividade de artérias de condutância e resistência ao inibidor da ROCK

A adição do composto Y-27632 (inibidor da ROCK) em anéis de aorta ou mesentérica, previamente contraídos por fenilefrina, promoveu relaxamento de modo semelhante em todos os grupos testados (Figura 19).



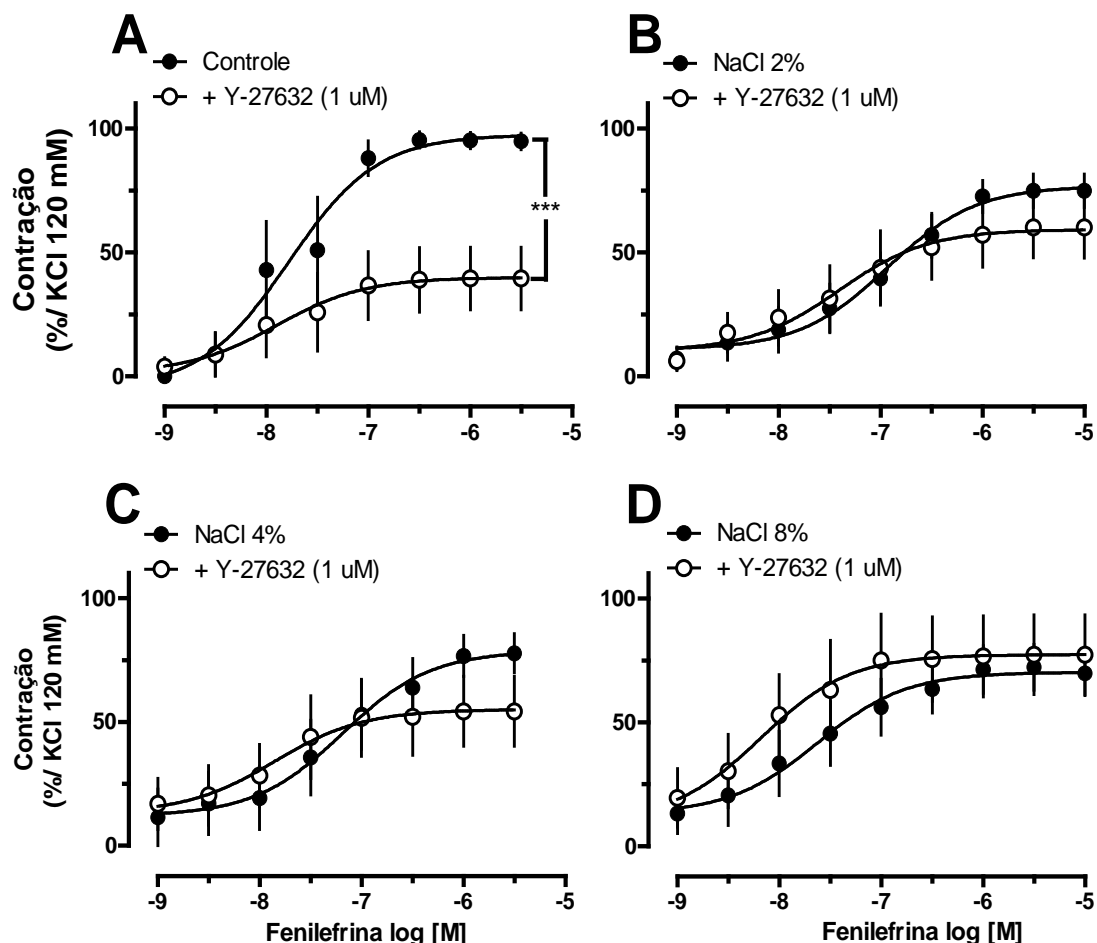
**Figura 19: Relaxamento induzido pelo inibidor da ROCK em anéis de artérias aorta e mesentéricas de resistência.** Respostas dependentes da concentração para composto Y-27632 em artérias aorta **(A)** e mesentéricas **(B)** isoladas de ratos normotensos tratados com dieta padrão (controle) ou com altas concentrações de NaCl. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 experimentos em cada grupo. A análise estatística foi feita usando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram encontradas diferenças significativas estatisticamente.

#### 5.14 - Efeito do composto Y-27632 na contração induzida pela fenilefrina

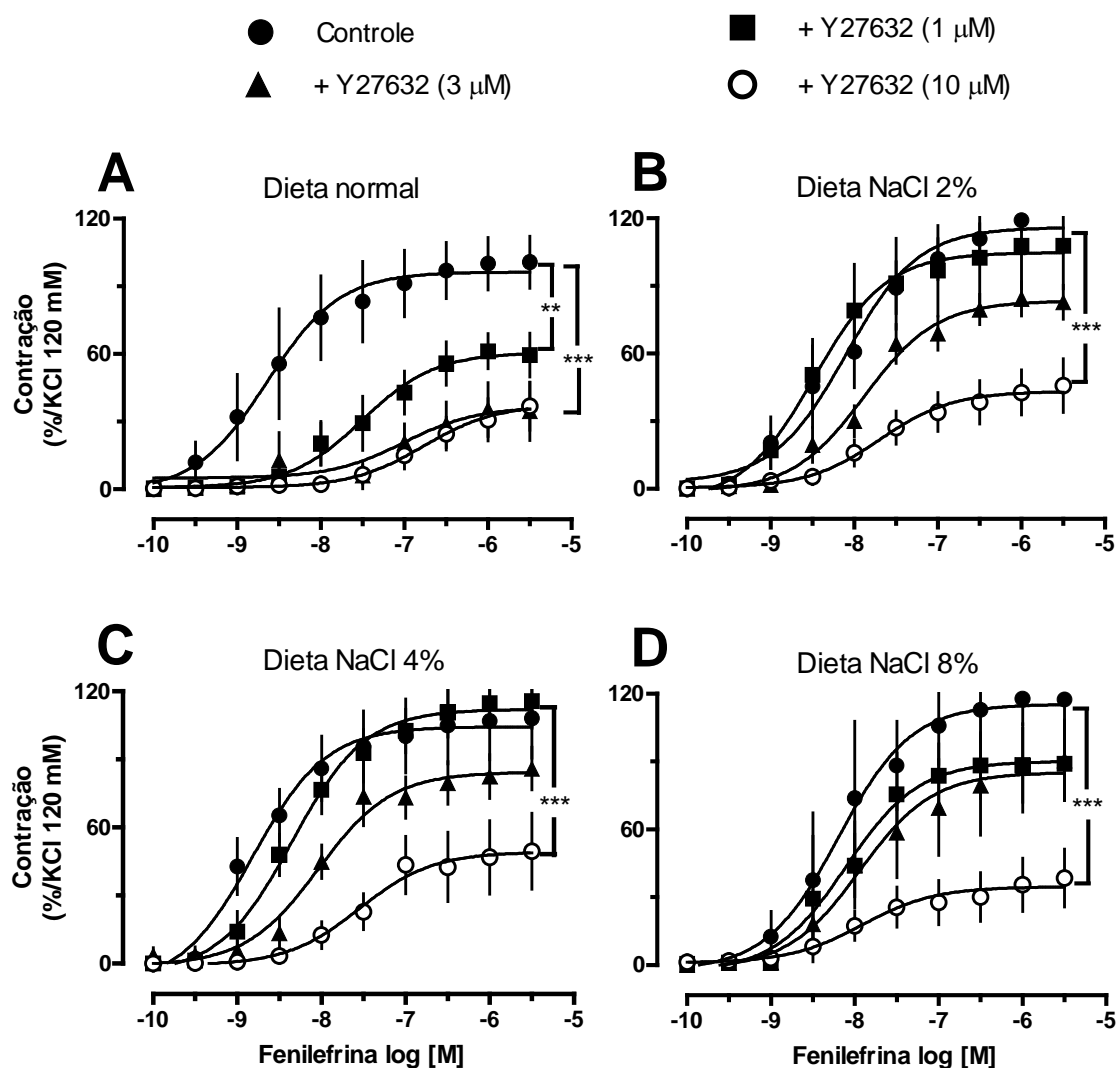
O composto Y-27632, inibidor da ROCK ( $1 \mu\text{M}$ ), reduziu em aproximadamente 60% da contração máxima induzida pela fenilefrina em anéis de aorta (com endotélio) dos animais controle (Figura 20A), mas não reduziu a resposta contrátil nos anéis de aorta oriundos dos animais *high salt* (Figuras 20B, C e D). Resultados semelhantes foram obtidos em vasos (aorta) desprovidos de endotélio. Nestes experimentos expusemos as preparações a diferentes concentrações do composto Y-27632 e observamos que somente a maior concentração testada ( $10 \mu\text{M}$ ) foi capaz de inibir a contração em aortas de ratos dos grupos NaCl 2, 4 e 8% (Figura 21D).

Como os resultados com o composto Y-27632 foram observados em todos os grupos, escolhemos o tratamento com NaCl 4% para continuar os estudos com pequenas artérias mesentéricas. Nos vasos de resistência de ratos controle, cerca de 46% da contração induzida pela fenilefrina foi inibida pelo composto Y-27632 na concentração de  $3 \mu\text{M}$  (Figura 22A). Entretanto, em vasos provenientes

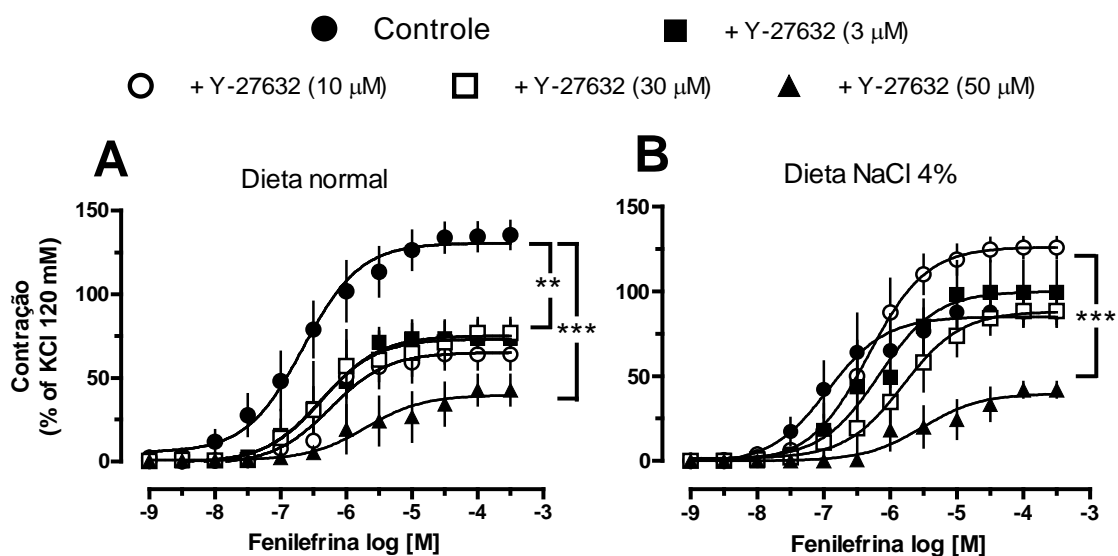
de ratos expostos à dieta NaCl 4% foi necessário uma concentração de 50  $\mu$ M para inibir a ação contrátil da fenilefrina (Figura 22B).



**Figura 20: Efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta com endotélio.** Curvas concentração-resposta para a fenilefrina foram obtidos na presença (○) ou ausência (●) do composto Y-27632. Os painéis **A**, **B**, **C** e **D** representam, respectivamente, aortas oriundas de ratos controle, NaCl 2, 4 e 8%. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 experimentos em grupo. A análise estatística foi feita usando o teste ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.



**Figura 21: Efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta sem endotélio.** Curvas concentração-resposta para fenilefrina foram obtidas na presença ou ausência do composto Y-27632. Os painéis **A**, **B**, **C** e **D** representam, respectivamente, aortas oriundas de ratos controle, NaCl 2, 4 e 8%. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 experimentos em cada grupo. A análise estatística foi feita usando o teste ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.



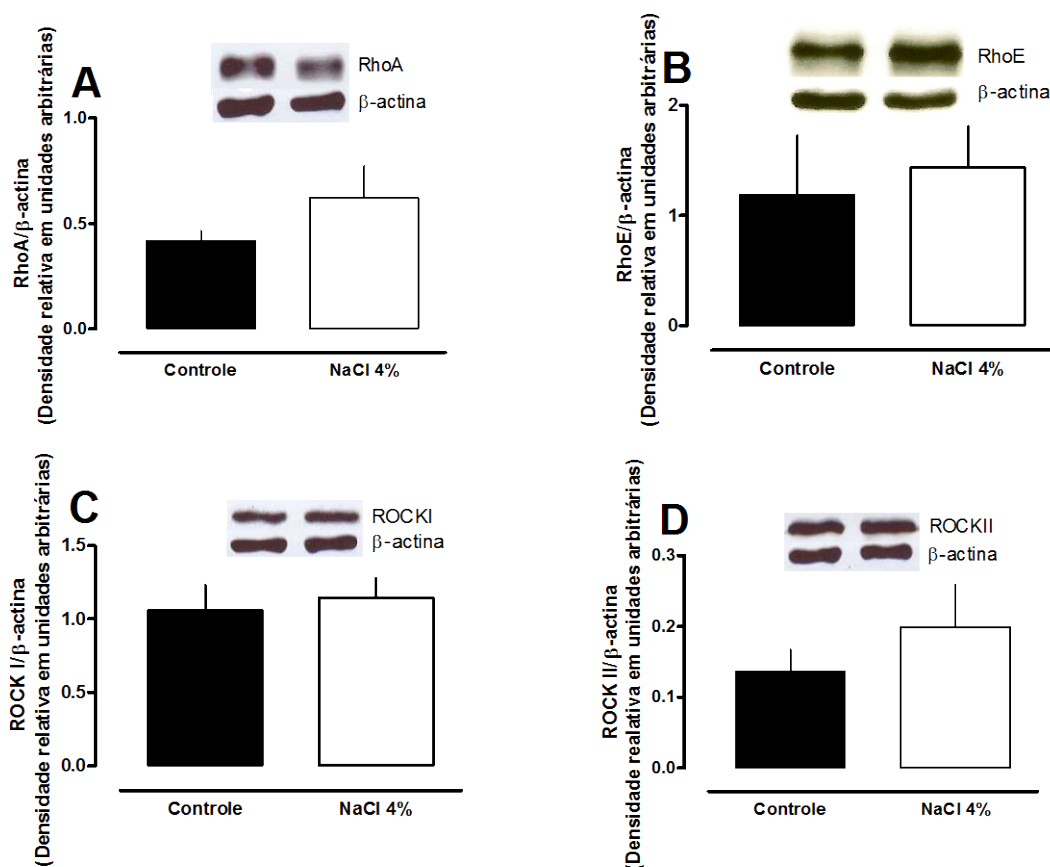
**Figura 22: Efeito do composto Y-27632 em anéis de artéria mesentéricas contraídos pela fenilefrina.** Curva concentração-resposta de fenilefrina na presença ou ausência do composto Y-27632 em artéria mesentérica de ratos controle (**A**) ou *high salt* (**B**). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 experimentos em cada grupo. A análise estatística foi feita usando o teste ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.

### 5.15 - Efeito da dieta hipersódica na expressão de proteínas da via RhoA/ROCK

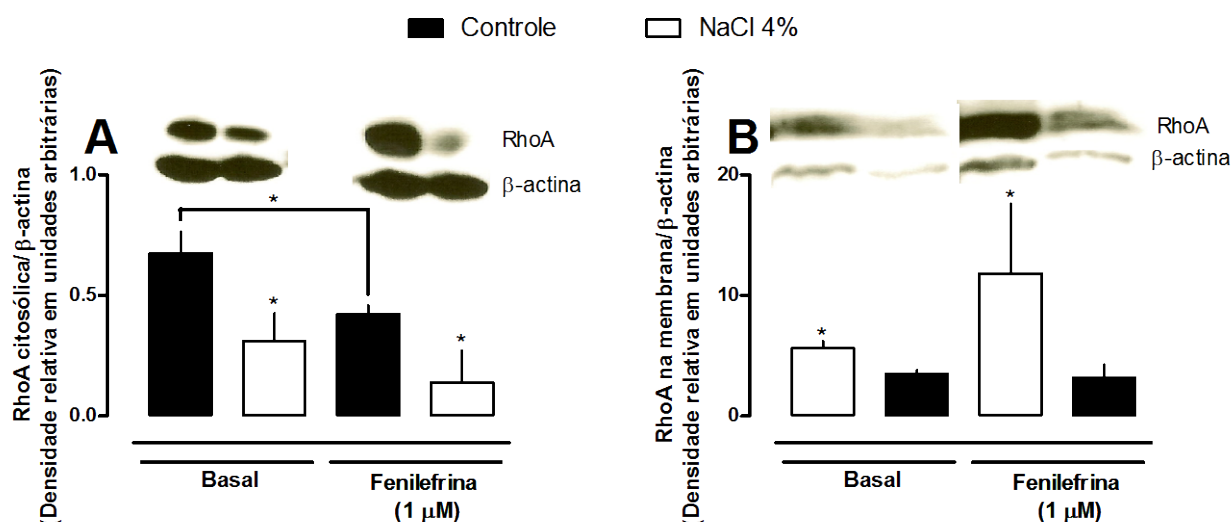
Nessa etapa os experimentos para verificar a expressão de proteínas foram realizados utilizando aortas de ratos dos grupos *high salt* e controle. O tratamento com a dieta NaCl 4% não alterou significativamente a expressão total da RhoA (Figura 23A) e tampouco da RhoE (Figura 23B). Da mesma forma a expressão das proteínas ROCKI e ROCKII foi semelhante entre os grupos (Figura 23C e D). Entretanto, houve redução da RhoA citosólica (42%) (Figura 24A) e aumento da RhoA de membrana (ativa) em cerca de 40% (Figura 24B) em aorta de ratos NaCl 4% quando comparados ao grupo controle. De modo semelhante, quando as aortas foram previamente estimulados com fenilefrina, ocorreu aumento na expressão de RhoA na membrana acompanhada de redução da expressão dessa proteína no citosol. Nessas aortas estimuladas com fenilefrina, a expressão de RhoA ativa (de membrana) foi 80% maior em ratos NaCl 4% do que em animais controle (Figura 24B). Ao mesmo tempo a expressão de RhoA no



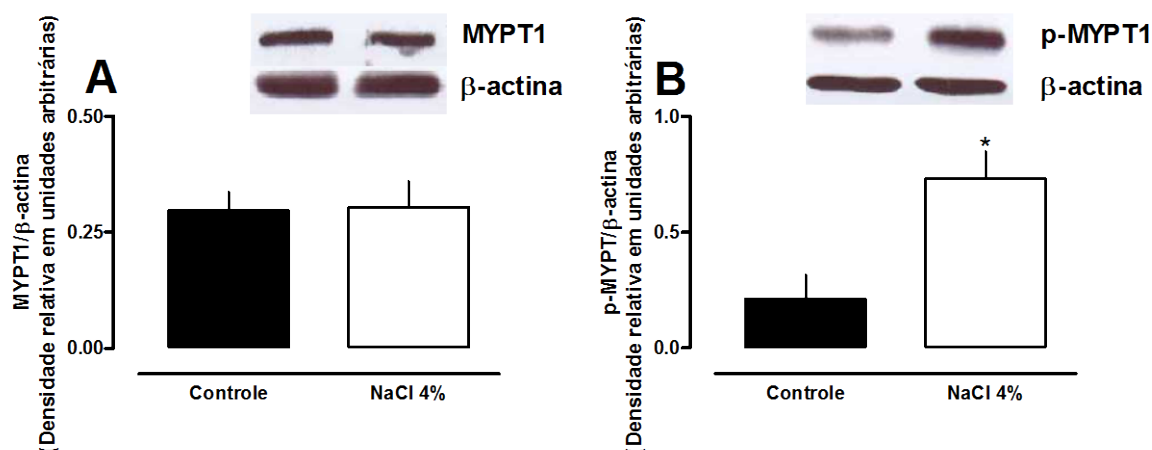
citossol foi reduzida em 65% nas aortas *high salt* em relação ao controle (Figura 24A). Além disso, a aorta de animais expostos à ração NaCl 4% tiveram aumento na expressão da MYPT1 fosforilada (p-MYPT1) em mais de 200% (Figura 25B), sem alterar a MYPT1 total (Figura 25A).



**Figura 23: Expressão de RhoA, RhoE, ROCKI e ROCKII em aorta de ratos.** A expressão das proteínas RhoA (**A**), RhoE (**B**), ROCKI (**C**) e ROCKII (**D**) em aorta isolada de ratos controle e NaCl 4% foi mensurada pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela  $\beta$ -actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 amostras por grupo, obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando teste *t student* (B). Não houve diferenças com significância estatística.



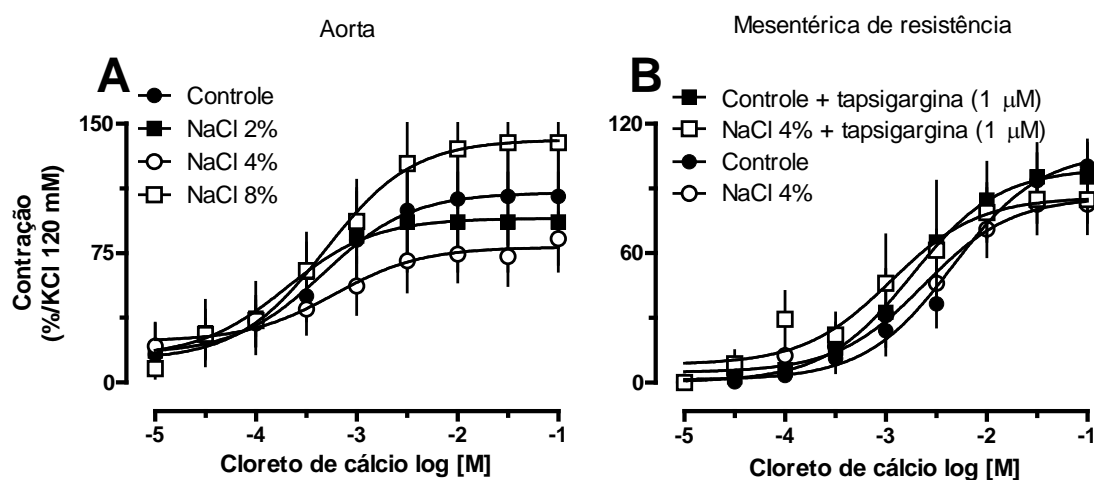
**Figura 24: Aumento da expressão de RhoA na membrana na aorta de ratos tratados com dieta *high salt*.** Expressão de proteínas de RhoA citosólica (A) e de membrana (B) com e sem estímulo com fenilefrina. A expressão de proteínas foi mensurada em aorta isolada de ratos controle e NaCl 4% pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela β-actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 3 amostras por grupo, obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando teste *t student*. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 25: Aumento da expressão da MYPT1 fosforilada de em anéis de aorta de ratos tratados com dieta *high salt*.** A expressão proteica de MYPT1 total (A) e MYPT1 fosforilada (p-MYPT1) (B) na aorta de ratos dos grupos controle e NaCl 4% foi mensurada pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela β-actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 5 amostras por grupo, obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando teste *t student* (B). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.16 - Efeito da dieta *high salt* no influxo de cálcio em preparações vasculares

Artérias aorta submetidas a concentrações cumulativas de cloreto de cálcio, em líquido despolarizante, apresentaram respostas semelhantes em todos os grupos (Figura 26A). Além disso, as contrações induzidas por cloreto de cálcio em artérias mesentéricas não diferiram entre os grupos testados, tanto na ausência quanto na presença da taspigargina (Figura 26B).

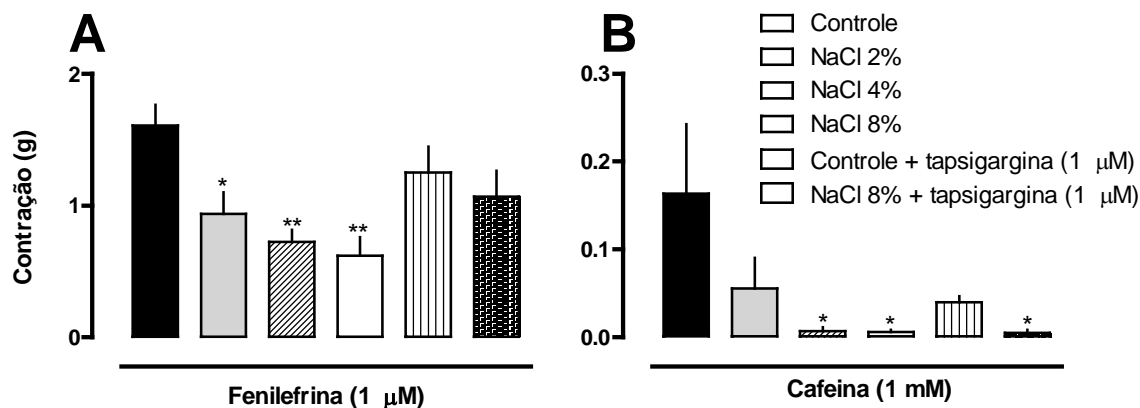


**Figura 26: Efeito da dieta *high salt* no influxo de cálcio.** Curva concentração-resposta de cloreto de cálcio (A) em artéria aorta de ratos controle ou *high salt*. O painéis (C) representa artérias mesentéricas oriundas de ratos controle e NaCl 4%, expostas a concentrações cumulativas de cloreto de cálcio na ausência e na presença de taspigargina, respectivamente. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-7 experimentos cada grupo. A análise estatística foi feita usando o teste de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

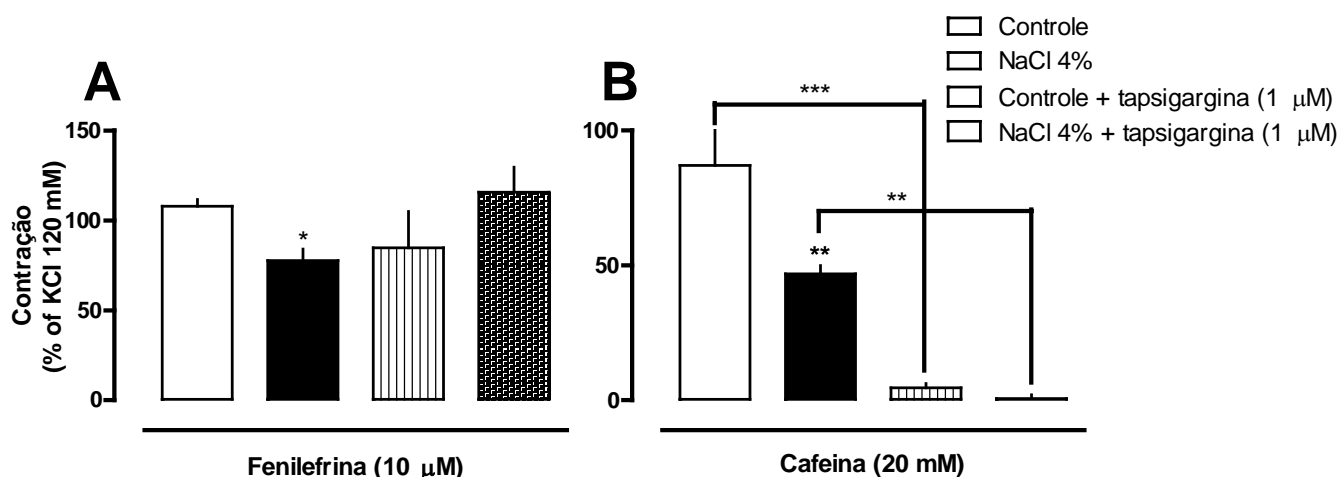
### 5.17 - Efeito da dieta hipersódica sobre a liberação de cálcio do retículo endoplasmático em preparações vasculares

A contração induzida por fenilefrina em meio livre de cálcio causou uma resposta significativamente menor em anéis de aorta provenientes de ratos expostos à dieta com cloreto de sódio. A contração obtida, respectivamente em aortas de ratos dos grupos NaCl 2, 4 e 8%, foi 42, 52 e 62% menor do que a apresentada por vasos de animais do grupo controle. Este efeito foi abolido pela

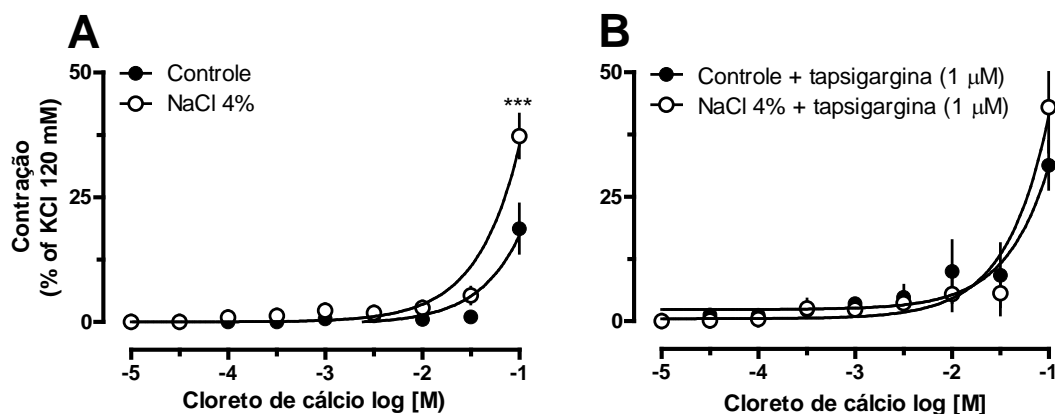
adição de tapsigargina (1  $\mu$ M) em preparações de aorta de ratos expostos à dieta *high salt* 8% (Figura 27A). Por sua vez, o efeito contrátil da cafeína também foi inibido em, cerca de 85%, nos grupos NaCl 4 e 8%. Entretanto, a tapsigargina não alterou a contração induzida pela cafeína nos ratos expostos a dieta *high salt* (Figura 27B). Os anéis de pequenas artérias mesentéricas obtidas de ratos NaCl 4% tiveram uma redução de aproximadamente 25% na contração estimulada por fenilefrina em meio livre de cálcio quando comparada com aorta do grupo controle (Figura 28A). De modo semelhante, frente ao estímulo da cafeína as artérias mesentéricas de ratos NaCl 4% tiveram a contração reduzida em cerca de 48% em relação ao grupo controle. Essa alteração não foi observada na presença da tapsigargina (Figura 28B). Além disso, a adição de cloreto de cálcio em preparações em meio livre de cálcio, fez com que a contração máxima de anéis de artérias mesentéricas oriundas de ratos do grupo NaCl 4% aumentasse 45% em relação às artérias do grupo controle (Figura 29A). A pré-incubação com tapsigargina fez com que a contração fosse semelhante em artérias mesentéricas de ambos os grupos (Figura 29B).



**Figura 27: Efeito da dieta *high salt* na liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático de artérias aorta.** As preparações foram expostas a uma única concentração de fenilefrina (**A**) ou cafeína (**B**). O mesmo protocolo foi repetido na presença de tapsigargina. Os protocolos foram realizados usando anéis de aorta de ratos controle ou *high salt* acondicionados em cubas com solução nutritiva sem cálcio. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-8 experimentos cada grupo. A análise estatística foi feita usando o ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao respectivo grupo controle.



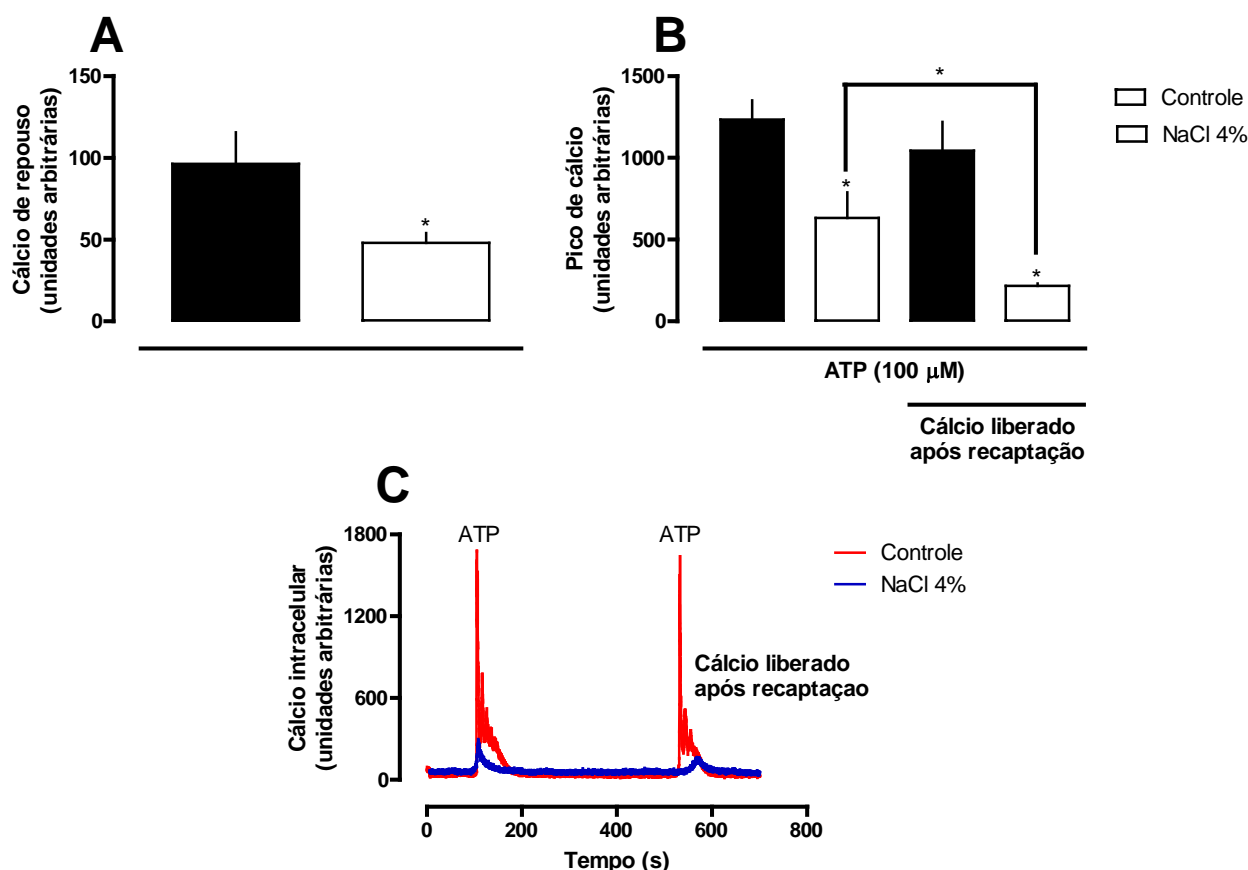
**Figura 28: Efeito da dieta *high salt* na liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático de artérias mesentéricas.** A contração dos anéis mesentéricos foi induzida por fenilefrina **(A)** ou cafeína **(B)** na presença ou ausência de tapsigargina. As drogas foram adicionadas a banhos com solução nutritiva sem cálcio. Foram usados vasos oriundos de ratos controle ou expostos uma dieta com NaCl 4%. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-7 experimentos cada grupo. A análise estatística foi feita usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.



**Figura 29: Aumento da contração induzida por CaCl<sub>2</sub> em meio livre de cálcio.** Anéis de artérias mesentéricas de resistência, oriundas de ratos do grupo controle e NaCl 4%, foram expostas a concentrações cumulativas de cloreto de cálcio na ausência **(A)** e na presença de tapsigargina **(B)**. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 6-7 experimentos cada grupo. A análise estatística foi feita usando o teste de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

### **5.18 - Dieta *high salt* reduz a liberação e recaptação de cálcio intracelular em células musculares lisas de aorta**

Células musculares lisas isoladas de aorta de ratos *high salt* apresentaram redução de 50% nos níveis de cálcio intracelular durante o repouso, em relação a células do grupo controle (Figura 30A). A quantidade de cálcio liberado sob estímulo com ATP foi 48% menor em células de animais do grupo NaCl 4% (Figura 30B). Após depleção dos estoques de cálcio intracelular pelo ATP, foi feita a recarga do cálcio no retículo endoplasmático. Depois da recaptação do cálcio intracelular e novo estímulo com ATP, os níveis liberados foram cerca de menores do que anterior em células isoladas de aorta do grupo NaCl 4%. O pico de liberação foi cerca de 79% em relação ao controle nas mesmas condições (Figura 30B). A figura 27C representa um registro típico obtido durante a mensuração de cálcio em células isoladas de artérias aorta.

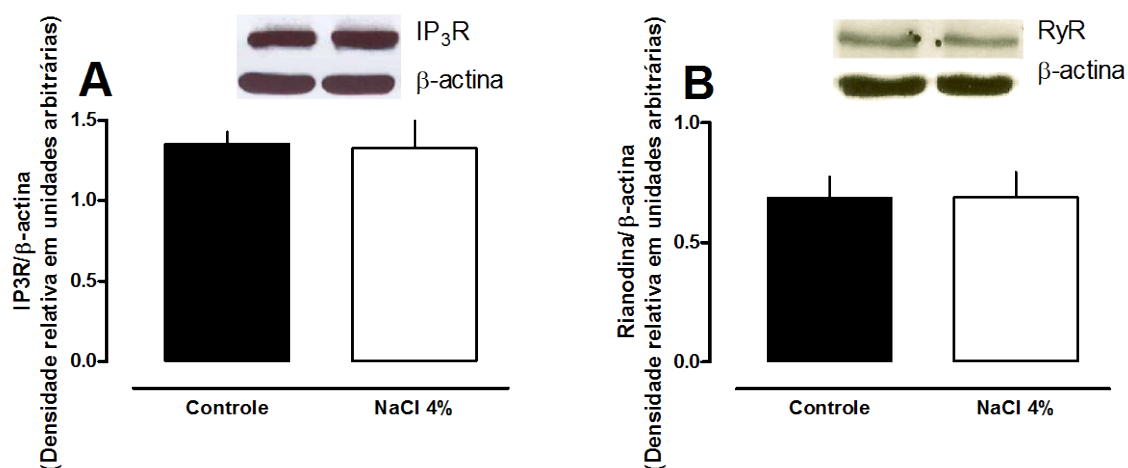


**Figura 30: Redução da liberação de cálcio intracelular em células musculares lisas de aorta.** Concentrações basais de cálcio intracelular citosólico **(A)**. Pico de liberação de cálcio estimulado pelo ATP, em condições normais e após depleção e recaptção **(B)**. Registro típico da mensuração do cálcio intracelular em células isoladas **(C)**. Os níveis de cálcio intracelular foram mensurados em células musculares lisas isoladas de aortas dos grupos controle e NaCl 4%. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 experimentos em cada grupo. A análise estatística foi feita usando o teste ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni **(B)** ou teste *t* student **(A)**. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.19 - Redução da expressão de SERCA em aortas de ratos *high salt*

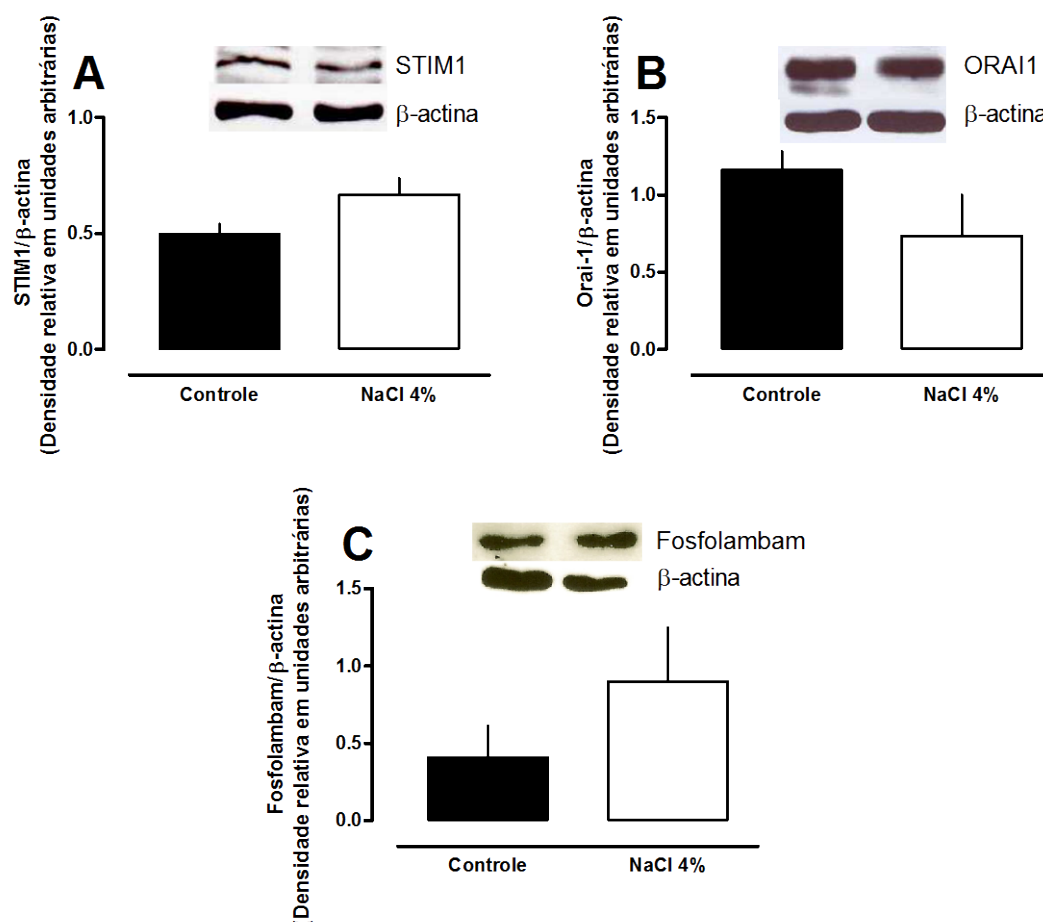
Os resultados anteriores nos levaram a pensar que uma ou mais proteínas envolvidas na regulação da liberação e/ou recaptção do cálcio intracelular poderiam ter sido influenciadas pela ingesta elevada de cloreto de sódio. Através do ensaio de *Western blot* observamos que os ratos expostos à dieta hipersódica (NaCl 4%) não tiveram alteração da expressão de receptores  $IP_3$  e rianodina (RyR) (Figura 31). De modo similar a expressão da STIM1, ORAI1 e fosfolambam

permaneceram inalteradas em aorta de ratos expostos a dieta *high salt* (Figura 32). Por outro lado, a aorta de animais que receberam esta mesma dieta tiveram a expressão das proteínas SERCA2 e SERCA3 reduzidas em 28 e 50%, respectivamente (Figura 33).

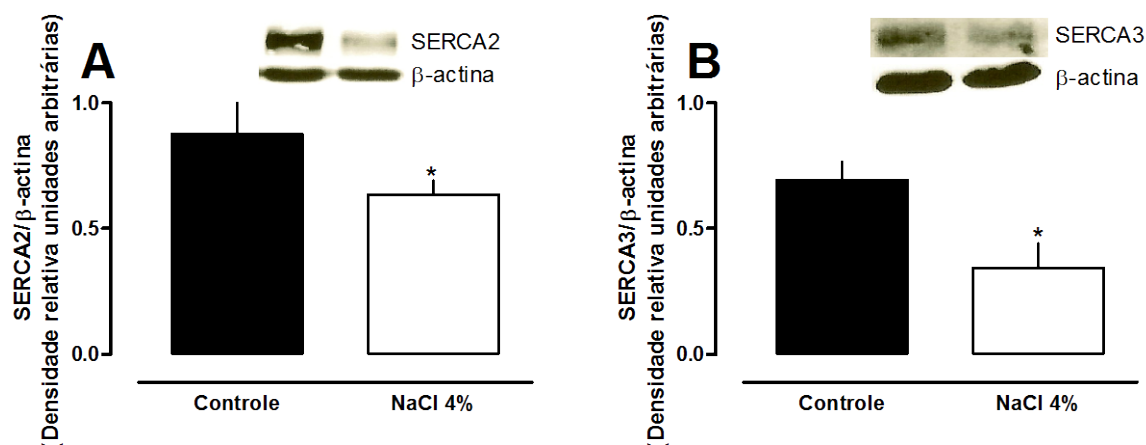


**Figura 31: Expressão dos receptores IP<sub>3</sub> e rianodina na aorta de ratos expostos à dieta *high salt*.** A expressão de receptores IP<sub>3</sub> (A) e rianodina (RyR) (B) foi mensurada pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela β-actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados expressam a média ± erro padrão da média de 5 amostras por grupo obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando teste *t student*.





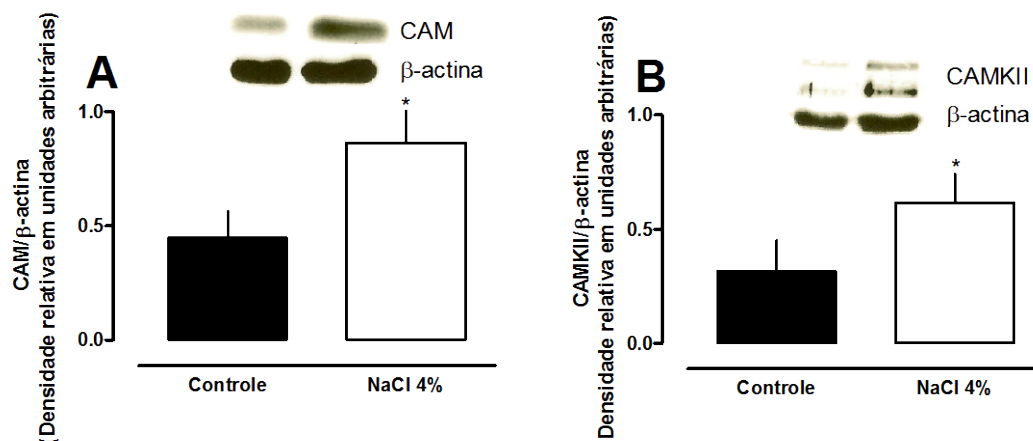
**Figura 32: Expressão de proteínas regulatórias do influxo de cálcio em aorta de ratos *high salt*.** Expressão de STIM1 (A), Orai1 (B) e fosfolambam (C) em aortas isoladas de ratos NaCl 4% e controle. A expressão das proteínas foi mensurada pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela β-actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 5 amostras por grupo obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando teste *t student*.



**Figura 33: Redução da expressão da SERCA2 e SERCA3 em aortas de ratos *high salt*.** A expressão proteica de SERCA2 (A) e SERCA3 (B) em aorta isolada de ratos dos grupos controle e NaCl 4% foi mensurada pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela  $\beta$ -actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados demonstrados no gráfico representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 amostras por grupo obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando teste o *t student*. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

## 5.20 - A expressão de calmodulina foi aumentada em aorta de ratos expostos à dieta com NaCl 4%

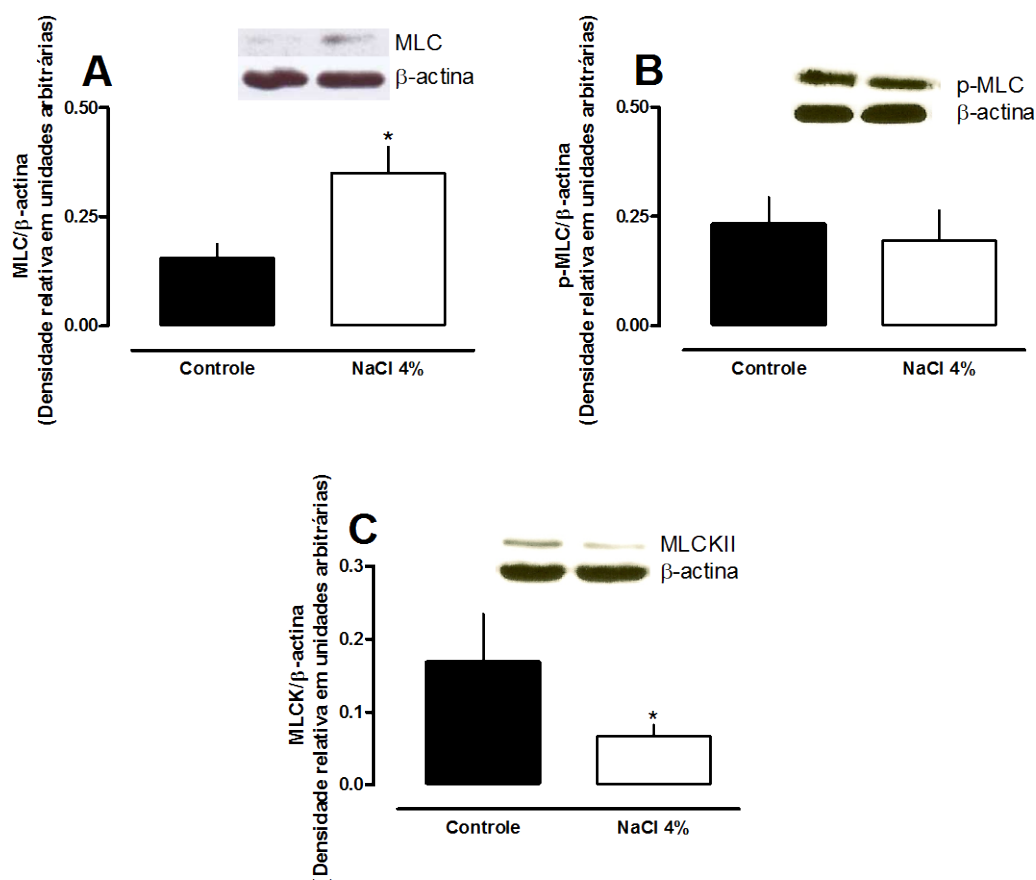
Animais normotensos jovens submetidos à dieta contendo NaCl 4% tiveram aumento de 90% na expressão da calmodulina (CAM) (Figura 34A). Esse resultado foi acompanhado do aumento da expressão da quinase dependente da cálcio/calmodulina II (CAMKII) em aortas do grupo NaCl 4%, (Figuras 34B).



**Figura 34: Aumento da expressão de calmodulina e da CAMKII em aorta de ratos tratados com dieta *high salt*.** Expressão de proteínas de calmodulina (CAM) **(A)**, quinase dependente da cálcio/calmodulina II (CAMKII) **(B)** através do ensaio de *Western blot* em aorta isolada de ratos controle e NaCl 4%. Os valores foram normalizados pela β-actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 5 amostras por grupo, obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita por meio do teste *t student*. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.21 - Aumento da expressão da cadeia leve de miosina (MLC) em aorta de ratos expostos à dieta NaCl 4%

Observamos que aortas de ratos expostos a dieta hipersódica (NaCl 4%) tiveram aumento na expressão da cadeia leve de miosina (MLC) (Figura 35A). Por outro lado animais que receberam a mesma dieta não apresentaram alteração na expressão de MLC fosforilada (p-MLC) e nem da quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) (Figura 35B e C).



**Figura 35: Aumento da expressão de cadeia leve de miosina mas não da sua forma fosforilada em aorta de ratos expostos a dieta NaCl 4%.** A expressão de proteínas cadeia leve de miosina (MLC) total **(A)**, MLC fosforilada (p-MLC) **(B)** e MLC quinase (MLCK) em aorta isolada de ratos controle e NaCl 4% foi mensurada pelo ensaio de *Western blot*. Os valores foram normalizados pela β-actina e expressos em unidades arbitrárias. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 4-5 amostras por grupo obtidas de animais diferentes. A análise estatística foi feita usando teste *t student*. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

## VI - DISCUSSÃO

A hipertensão é a doença crônica mais comum entre a população adulta mundial e configura fator de risco para outros problemas potencialmente fatais como infarto do miocárdio, AVC e falência renal (MOSTERD *et al.* 1999; KANNEL 2000). Fatores genéticos e ambientais podem estar envolvidos na gênese da hipertensão (IWAMOTO *et al.* 2005). Nesse contexto o excesso de sal tem figurado como um dos fatores ambientais relacionados com o desenvolvimento da hipertensão e alterações importantes no sistema cardiovascular (NURKIEWICZ e BOEGEHOLD 2007; TAKEDA *et al.* 2007).

O consumo crescente de alimentos e bebidas industrializados e/ou processados com alto teor de sódio, principalmente pela população infantil, tem se mostrado um fato preocupante. Neste sentido, podemos dizer que a ingesta de altas quantidades de sódio acontece desde estágios iniciais da vida e permanece durante a infância, adolescência e na maioria das vezes por toda a vida adulta. No presente estudo avaliamos os efeitos da ingesta elevada de cloreto de sódio em ratos pós desmame, que foram submetidos a ração com 7 (grupo tratado com NaCl 2%) a 30 (grupo que recebeu ração NaCl 8%) vezes mais sal do que a quantidade presente na alimentação padrão. Se comparado com humanos, pode ser considerado que em nossos experimentos os animais receberam dieta *high salt*, continuamente por toda a infância até a idade de adultos jovens. Apesar do consumo elevado de sódio ser descrito como um contribuinte para o desenvolvimento da hipertensão, depois de seis semanas de dieta *high salt*, nenhum dos animais avaliados teve elevação da pressão arterial. Mesmo quando a pressão arterial foi avaliada em animais conscientes, uma estratégia que diferentemente de experimentos realizados com ratos anestesiados mantém todos os eventuais efeitos do sal no sistema nervoso central, incluindo os efeitos simpatoexcitatórios, os quais tem sido demonstrados em animais expostos à dieta *high salt* e associados à hipertensão induzida pelo sal, principalmente em indivíduos sensíveis ao sal (HUANG e LEENEN 1998; CARLSON *et al.* 2000; HUANG *et al.* 2001).

O não desenvolvimento de um quadro de hipertensão em nossos estudos não foi um fato inesperado, pois pouquíssimos experimentos tem relatado

aumento da pressão arterial quando ratos normotensos são expostos a altas concentrações de sódio na dieta (YU *et al.* 1998). Além disso, alguns estudos tem estabelecido que o excesso de sal pode causar alterações cardiovasculares importantes como o remodelamento vascular, aumento da massa do ventrículo esquerdo e aumento da incidência de AVC independente da elevação da pressão arterial (MUNTZEL e DRUEKE 1992; RAPP 2000; MENETON *et al.* 2005). De fato a hipertensão pode ser facilmente alcançada em animais submetidos ao excesso de sódio quando for associado ao tratamento com mineralocorticoide (acetato de deoxicorticosterona – DOCA sal) (KATHOLI *et al.* 1980; SCHUPP *et al.* 2011), administração de angiotensina II (LARA *et al.* 2012), ou animais geneticamente selecionados (Dahl sal sensíveis) (BOUHNICK *et al.* 1992). A literatura descreve o SRAA como um dos sistemas mais afetados em modelos de hipertensão relacionados com a ingesta excessiva de sal e nesse caso, pelo menos nos dois primeiros modelos mencionados, a hipertensão é dependente da ativação do SRAA. Além disso, a maior atividade do SRAA pode contribuir para vários efeitos deletérios nos animais Dahl sal sensíveis (BOUHNICK *et al.* 1992; ZHAO *et al.* 2001). Nesse sentido, embora geralmente não descrito na literatura, a capacidade de uma dieta elevada de sódio para aumentar a pressão arterial em ratos normotensos parece ser, ao menos em parte, dependente da ativação endógena ou farmacológica do SRAA.

A hipertensão e, principalmente a resposta para a angiotensina II em animais sensíveis ao sal, tem sido intensamente investigada nos últimos anos. Já foi demonstrado que, o tratamento com antagonistas seletivos para receptores AT1 previne a hipertensão e a fibrose cardíaca além de reduzir a hipertrofia do ventrículo esquerdo (LIANG e LEENEN 2008). No sistema nervoso central a maior ativação de receptores AT1 no núcleo paraventricular pode contribuir para o aumento da atividade simpática e consequentemente hipertensão em ratos Dahl sensíveis expostos a altas concentrações de sódio (GABOR e LEENEN 2012). Além disso, ratos espontaneamente hipertensos expostos a uma dieta elevada de sal durante 4 semanas apresentaram aumento dos níveis de angiotensina II, apesar de quantidades reduzidas de atividade da renina e ECA no soro (HODGE *et al.* 2002).

Contudo, a ativação e funcionalidade do SRAA em ratos não sensíveis ao sal ou normotensos expostos a quantidades elevadas de sódio ainda tem algumas lacunas a serem investigadas. Nesse sentido, Gonzalez e colaboradores demonstraram que altas concentrações de NaCl na água por poucos dias foi capaz de causar redução do efeito vasodilatador em resposta à angiotensina II em pequenas artérias mesentéricas. Esse efeito foi relacionado à redução da expressão de receptores AT<sub>2</sub> e foi revertido com a administração de aldosterona (GONZALEZ *et al.* 2005). Em outro estudo, ratos Sprague-Dawley adultos expostos à altas quantidades de sódio na dieta por 2 semanas tiveram redução da angiogênese e dos níveis de angiotensina II em células de músculo esquelético. Esse efeito foi revertido pela administração de angiotensina II (PETERSEN *et al.* 2006). Entretanto, em camundongos normotensos, a ingestão de dieta *high salt* induziu hipertrofia cardíaca e fibrose intestinal. Ambos os efeitos foram prevenidos pela inibição farmacológica dos receptores AT<sub>1</sub> ou da ECA (LE CORVOISIER *et al.* 2010).

Em nossos estudos, usando ratos Wistar, normotensos, jovens e saudáveis, nós observamos que os grupos expostos à dieta *high salt* 4 e 8% apresentaram aumento expressivo da resposta hipertensora induzida pela administração intravenosa das angiotensina I e II. A hiper-responsividade pronunciada desses animais para angiotensina I, quando comparados com a angiotensina II, nos levou a investigar o papel da ECA nesse evento. Nossos resultados demonstraram que no grupo NaCl 8% a atividade da ECA foi maior quando comparada com o grupo controle, sugerindo que altas quantidades de sal adicionadas à dieta, aumentam a atividade dessa enzima o que provavelmente contribuiu para a elevação do efeito hipertensivo da angiotensina I encontrado em nossos experimentos. É importante ressaltar que a maior atividade da ECA observada *ex vivo* foi acompanhada da redução no tempo de efeito hipotensor induzido pela bradicinina nestes animais (NaCl 8%), sugerindo que há também maior atividade da ECA a nível sistêmico.

Vale salientar que a maior sensibilidade para angiotensina I, angiotensina II e aumento da atividade da ECA plasmática ocorreram de forma independente da hipertensão. Essa aparente discrepância pode ser melhor compreendida quando os próximos achados forem considerados: i) apesar do aumento da atividade da

ECA plasmática no grupo NaCl 8%, os níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona foram significativamente reduzidos em ambos os grupos, NaCl 4 e 8%; ii) a expressão de receptores AT1 foi aumentada enquanto a expressão de receptores AT2 foi reduzida em aortas provenientes de ratos tratados com dieta NaCl 4%. A aldosterona é um dos principais moduladores do balanço de sódio e potássio e desempenha um papel importante na regulação do volume extracelular. O aumento dos níveis de aldosterona leva à maior reabsorção de sódio e água nos túbulos distais e coletores renais (FUNDER 2002). Em nosso estudo a redução dos níveis circulantes de aldosterona certamente contribuiu para maior excreção de sódio e água do organismo dos animais mantendo a homeostasia dos eletrólitos plasmáticos e consequente balanço eletrolítico. Em relação aos níveis plasmáticos de angiotensina II, vários estudos desenvolvidos nos últimos anos revelaram uma relação intrigante entre a ingestão de sódio e os níveis circulantes desse peptídeo. A redução do consumo de sódio parece ser capaz de aumentar a quantidade de angiotensina II no plasma de ratos normais. O oposto, níveis reduzidos de angiotensina II após a ingestão elevada de sódio também tem sido descrito (WEINBERGER *et al.* 1986).

Embora os mecanismos responsáveis por esta tentativa do organismo para regular SRAA em termos de consumo de sódio ainda precisem ser elucidados, o nosso estudo revela que, além de alterações nos níveis circulantes de angiotensina II, a atividade plasmática da ECA, bem como a expressão de ambos, receptores AT1 e AT2 da angiotensina II, foram alteradas em ratos jovens normotensos expostos à ingestão excessiva de sódio desde o desmame. A maior densidade de receptores AT1 pode explicar o aumento da resposta vascular encontrada após a administração intravenosa de angiotensina I e II em ratos anestesiados submetidos à dieta *high salt*. Embora a super expressão de receptores AT1 tenha sido previamente descrito (AGUILERA e CATT 1981; PLATIA *et al.* 1986; SANDBERG *et al.* 1994), o foco principal de tais estudos foi investigar apenas alterações locais em receptores AT1 ou modificações relacionadas com a responsividade à angiotensina II. Assim, pelo menos ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo apresentando evidências funcionais e moleculares de que, embora a dieta rica em sal possa reduzir os níveis circulantes de angiotensina II, o sistema vascular é mais sensível à



angiotensina II devido a um aumento da expressão de receptores AT1. Além disso, a expressão de receptores AT2, muitas vezes associada com a vasodilatação (VAN ESCH *et al.* 2006) e outros efeitos cardiovasculares potencialmente benéficos (SIRAGY 2009), foi reduzida significativamente após a ingestão elevada de sódio.

Estudos recentes indicam que uma dieta *high salt* também pode prejudicar a resposta dos vasos a agentes vasodilatadores com mecanismos de ação dependentes de endotélio, como por exemplo reduzir o efeito hipotensor induzido pela acetilcolina (BOEGEHOLD 1993; LIU *et al.* 1999; WEBER e LOMBARD 2000). Tal efeito pode resultar da liberação de fatores contraturantes derivados do endotélio, oriundos do metabolismo das ciclooxigenases (FORTES *et al.* 1990; FU-XIANG *et al.* 1992; ITO e CARRETERO 1992). Em vasos mesentéricos de resistência de ratos SHR, a resposta vasodilatadora da acetilcolina pôde ser parcialmente restaurada pela indometacina, sugerindo que a acetilcolina estimula a liberação de algum prostanóide constritor, além do NO (LUSCHER *et al.* 1990). Outro estudo descreveu os efeitos da dieta *high salt* na responsividade de artérias de resistência a doadores de NO e concluiu que a sensibilidade para o NO permanece inalterada em animais *high salt*. Isso sugere que as alterações no sinal de transdução da acetilcolina ocorrem devido aos níveis de óxido nítrico sintase (NOS) e sua ativação (LUSCHER *et al.* 1990; BOEGEHOLD 1993; FRISBEE e LOMBARD 1999; FRISBEE e LOMBARD 1999; LIU *et al.* 1999). Nesse sentido um estudo realizado por Sylvester e colaboradores sugere que a redução do efeito vasodilatador da acetilcolina, em artérias cerebrais de ratos Sprague-Dawley expostos à dieta *high salt*, se deve a uma inibição da síntese de NO e que tal evento está relacionado com o montante de NOS e não com a produção elevada de ânion superóxido ou com a produção de agentes constritores derivados do metabolismo das ciclooxigenases (SYLVESTER *et al.* 2002). Apesar de não termos investigado profundamente os motivos pelos quais a acetilcolina induz menor resposta vasodilatadora em ratos *high salt* verificamos que o efeito descrito na literatura se repetiu em nossos experimentos *in vivo*, tanto para acetilcolina quanto para o nitroprussiato. Esses dados associados com a redução dos níveis plasmáticos de NO no grupo NaCl 8%, confirmam os dados da literatura, ou seja, a dieta *high salt* é capaz de induzir mudanças na via de

sinalização da acetilcolina e esta parece envolver uma inibição na via de produção do NO. Entretanto, vale ressaltar que os efeitos da acetilcolina foram verificados em artérias mesentéricas de resistência e em aorta e não encontramos diferenças entre os grupos.

Por outro lado, a via de sinalização do NO também sofre impacto inibitório pela via RhoA/ROCK levando à redução dos níveis de NO (WIRTH 2010). Isso acontece porque a RhoA/ROCK regula negativamente a fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) através da inibição da proteína quinase B (PKB), enquanto a redução na expressão de eNOS pela RhoA/ROCK se dá de forma independente da PKB (MING *et al.* 2002). Esse fato pôde ser confirmado utilizando-se fasudil, um inibidor da via Rho/ROCK, o qual aumentou a expressão de eNOS em cultura de células endoteliais (WOLFRUM *et al.* 2004). Outrossim, animais SHR-DOCA sal tiveram uma redução na expressão de eNOS renal que foi restaurada pelo tratamento com fasudil (ISHIKAWA *et al.* 2006).

A RhoA e a ROCK têm sido intensamente estudadas nos últimos anos e participam de uma variedade de funções fisiológicas importantes na vasculatura, incluindo contração do músculo liso, proliferação, adesão e migração celular e aspectos da resposta inflamatória (RIENTO e RIDLEY 2003). Nesse ínterim, anormalidades nessa via tem sido associadas com várias doenças cardiovasculares, inclusive hipertensão (WIRTH 2010). Alterações na atividade e sinalização da via RhoA/ROCK tem sido propostos como fatores contribuintes para o aumento da resistência vascular periférica nos quadros de hipertensão (UEHATA *et al.* 1997; MASUMOTO *et al.* 2001; WEBER e WEBB 2001; ASANO e NOMURA 2003). Essa maior atividade, evidenciada pelo aumento da fosforilação do substrato da ROCK, também observado em modelos de hipertensão como ratos SHR e DOCA sal (SEKO *et al.* 2003). Apesar de serem dois modelos diferentes onde ratos SHR apresentam altas concentrações de renina e animais DOCA sal têm baixos níveis de renina (PINTO *et al.* 1998) ambos têm um denominador comum: o aumento da atividade da ROCK (DOE *et al.* 2007). A administração do inibidor da ROCK, composto Y-27632 reduziu a pressão arterial em ratos SHR (UEHATA *et al.* 1997), melhorou a função cardíaca em quadros de insuficiência (SATO *et al.* 2003) e suprimiu a formação de lesão em modelo de aterosclerose (MALLAT *et al.* 2003). Em ratos com hipertensão induzida pela

administração de L-NAME (inibidor da NOS) o tratamento com composto Y-27632 foi capaz de reduzir a pressão arterial sem alterar a expressão de proteínas como a RhoA e a ROCK (MING *et al.* 2002).

Considerando que em vários modelos de hipertensão há aumento da atividade da via RhoA/ROCK, desde o início de nossos estudos hipotetizamos que animais expostos à dieta *high salt* desde o desmame até a idade adulta também poderiam ter alterações nessa via, mesmo sem o estabelecimento da hipertensão. Apesar disso, o relaxamento de pequenas artérias mesentéricas e aorta induzido pelo composto Y-27632 (inibidor da ROCK) não foi alterado em vasos de animais do grupo *high salt*. De modo semelhante, esses mesmos anéis de artérias aorta ou mesentéricas não apresentaram diferenças de respostas para a fenilefrina. Corroborando nossos dados, estudo realizado por Santos e colaboradores evidenciou que o leito vascular renal de ratos *Wistar* expostos à dieta *high salt* não apresentou alterações nas respostas à fenilefrina (DOS SANTOS *et al.* 2006). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que anéis de aorta oriundos de ratos *Sprague-Dawley* tiveram maior vasoconstrição em resposta à noradrenalina (OBIEFUNA *et al.* 1991; ADEGUNLOYE e SOFOLA 1997). Parte dessa divergência de resultados se deve provavelmente aos diferentes tipos de vasos utilizados nos estudos. Por isso ressaltamos os nossos resultados funcionais que foram obtidos em artéria aorta (vaso de condutância) e pequenas mesentéricas (vaso de resistência), sendo estas últimas conhecidas por ter um maior envolvimento no controle da pressão arterial (SOFOLA *et al.* 2002).

Nesse sentido testamos a responsividade à fenilefrina em artérias aorta e mesentéricas na presença do composto Y-27632. Em nossos experimentos a menor concentração testada reduziu a contração em vasos de ratos controle, mas não alterou a contração em artérias de animais expostos à dieta *high salt*. Foram necessárias concentrações aproximadamente 10 e 17 vezes maiores para que a contração das artérias aorta e mesentérica de resistência (respectivamente) provenientes de ratos *high salt* fossem inibidas de forma semelhante ao controle. Provavelmente, esse efeito tenha sido observado em razão da maior atividade da via RhoA/ROCK; conseqüentemente foram necessárias concentrações maiores do composto Y-27632 para inibir a contração.

A RhoA quando ativada faz a troca do GDP pelo GTP (com o auxílio dos GEFs) e se associa à membrana plasmática, fazendo o processo conhecido como translocação, onde a proteína migra do citosol para a membrana. Na sequência ocorre a ativação da ROCK que desencadeia uma série de eventos que irão culminar com a contração muscular (GONG *et al.* 1997). Em nossos experimentos observamos maior localização de RhoA na membrana com significativa redução no citosol, tanto em aorta do grupo NaCl 4% sem estímulo como em aortas *high salt* previamente estimuladas com fenilefrina. Esses resultados nos sugerem que, apesar da expressão total de RhoA, ROCKI e ROCKII não estarem aumentadas, há uma maior ativação dessa via, confirmada pela maior translocação da RhoA citosólica para a membrana plasmática.

Aortas de ratos do grupo NaCl 4% apresentaram aumento importante na expressão da MYPT1 fosforilada (estado inativo), sem alterações na expressão de MYPT1 total. Além disso, o aumento da atividade da via RhoA/ROCK também pode ser evidenciado pelo aumento da fosforilação da MYPT1, como observado em ratos SHR e DOCA sal (SEKO *et al.* 2003). Isso porque a ativação da RhoA e da ROCK conduz à fosforilação e inativação da subunidade de ligação da miosina fosfatase (MYPT1) (KIMURA *et al.* 1996). A MYPT1 remove um fosfato da miosina fazendo com que a interação cíclica actina/miosina seja interrompida levando ao relaxamento. Entretanto, quando a miosina é inativada por fosforilação ela permanece no estado fosforilado, mantendo assim a contração (WEHRWEIN *et al.* 2004). Com esses dados sugerimos que a dieta *high salt* aumenta a atividade da RhoA/ROCK que por sua vez contribui para maior inibição da miosina fosfatase, evidenciada pela maior fosforilação da MYPT1. Nesse sentido é importante ressaltar que apesar dos vários estudos envolvendo a via RhoA/ROCK, desconhecemos estudos prévios que tenham demonstrado que a dieta *high salt per se* seja capaz de promover essa maior ativação da via.

É bem estabelecido que a ativação da via RhoA/ROCK tem um papel fundamental na modulação da contração em vários tecidos, incluindo os vasos (LEUNG *et al.* 1996; WANG *et al.* 2002; WIBBERLEY *et al.* 2003). A RhoA/ROCK, também está envolvida com a sensibilização ao cálcio nas células musculares lisas (KAIBUCHI *et al.* 1999; SOMLYO e SOMLYO 2000; BOLZ *et al.* 2003; GHISDAL *et al.* 2003; SOMLYO e SOMLYO 2003; WILSON *et al.* 2005), por

participar da fosforilação de MLC em baixas concentrações de cálcio intracelular, mantendo assim a contração tônica do músculo liso (AMANO *et al.* 2000; SOMLYO e SOMLYO 2003). Considerando que a dieta *high salt* causou alterações importantes na via RhoA/ROCK e que esta via exerce influência na via do cálcio, hipotetizamos que um ou mais componentes da via de sinalização ao cálcio também poderiam ter sido modificados. Além disso, não houve aumento de responsividade à drogas vasoconstritoras, como por exemplo a fenilefrina, apesar da maior atividade da via RhoA/ROCK; assim, nossa hipótese considerava que alguma outra via estaria alterada, na tentativa de compensar a via de sinalização aumentada.

O tônus do músculo liso vascular é primariamente regulado pelo potencial de membrana. Muitos vasoconstritores atuam, em parte, por abrirem canais de cálcio dependentes de voltagem através da despolarização da membrana e ativação de segundos mensageiros (NELSON *et al.* 1990). Em animais SHR a concentração de cálcio nas células musculares lisas está elevada (NOON *et al.* 1978). Essa elevação pode contribuir para o aumento da responsividade dessas células a estímulos vasoconstritores e para a manutenção do tônus miogênico que caracteriza a hipertensão (BENDHACK *et al.* 1992; LUCCHESI *et al.* 1996). Estudos realizados com cultura de células de músculo liso vascular de ratos SHR apresentaram aumento na concentração de cálcio e resposta aumentada para angiotensina II (SUGIYAMA *et al.* 1990; BENDHACK *et al.* 1992; BODIN *et al.* 1993), atribuída à maior densidade de receptores para angiotensina II, ativação da fosfolipase C e D (RESINK *et al.* 1989) e alterações nos mecanismos de estocagem de cálcio (LEVITSKY *et al.* 1993). Além disso, em aortas de ratos DOCA-sal tanto o influxo de cálcio quanto a liberação de cálcio dos estoques intracelulares foram significativamente aumentados (DAVID *et al.* 2002). Nossos dados indicam que o influxo de cálcio não foi alterado em artérias aorta e nem mesentéricas de resistência provenientes de ratos do grupo *high salt*, pois as contrações induzidas por cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), em PSS despolarizante sem cálcio, foram semelhantes em todos os grupos (controle e *high salt*).

Alterações na sinalização em condições de depleção do cálcio do retículo endoplasmático, como por exemplo, a ausência de cálcio no retículo endoplasmático induzida pela taspigargina, resulta em estimulação contínua do

sensor de cálcio e abertura de canais de cálcio da membrana plasmática (NIKI *et al.* 1996; GU *et al.* 2008; GIACHINI *et al.* 2009). Por isso, bloqueamos a recaptação de cálcio para dentro do retículo endoplasmático com a adição de tapsigargina na preparação e repetimos a curva de  $\text{CaCl}_2$ . Esse experimento nos permitiu avaliar a entrada de cálcio na célula sem a interferência da recaptação deste íon pelo retículo endoplasmático. Além disso na situação experimental criada com a adição da tapsigargina, ocorre depleção dos estoques intracelulares de cálcio e estimulação de sensores de canais de cálcio de membrana como STIM1 e Orai1. Porém, não observamos diferença entre os grupos e por isso especulamos que a atividade desses sensores não foi alterada. De modo semelhante, a expressão de STIM1 e Orai1 em aortas de ratos expostos à dieta *high salt* não foi modificada, sugerindo que o modelo de dieta *high salt* que utilizamos não foi capaz de interferir com esses componentes de sinalização.

Além do cálcio que entra na célula através de canais de membrana, o cálcio armazenado nas organelas intracelulares, principalmente no retículo endoplasmático, também é importante no processo contrátil. Tendo em vista que o influxo de cálcio foi mantido em células de vasos oriundos de ratos pertencentes ao grupo *high salt*, tornou-se fundamental avaliar a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. O cálcio dessa organela pode ser liberado principalmente através de dois tipos de receptores:  $\text{IP}_3$  e rianodina. A cafeína é conhecida por causar liberação de cálcio atuando nos receptores de rianodina presentes no retículo endoplasmático, causando contração (HISAYAMA e TAKAYANAGI 1988; ROBINSON e BURGOYNE 1991). Por outro lado, a ativação do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico induz a ativação dos receptores  $\text{IP}_3$  localizados na membrana sarcoplasmática e liberação de cálcio armazenado nessa organela (WATRAS e BENEVOLENSKY 1987; GUILD *et al.* 1992; BERRIDGE 1993; JIN *et al.* 1993). Em nossos experimentos as preparações de artérias aorta ou pequenas mesentéricas do grupo *high salt* mantidas em meio livre de cálcio e contraídas por fenilefrina ou cafeína tiveram a resposta contrátil fortemente reduzida. A princípio esse resultado nos levou a avaliar a expressão dos receptores endoplasmáticos ativados por fenilefrina e cafeína. Porém, a expressão de ambos os receptores (rianodina e  $\text{IP}_3$ ) em aortas de ratos *high salt* não foi diferente entre os grupos, sugerindo-nos que a alteração observada não está relacionada com a liberação,

mas talvez com outra parte da via de sinalização como, por exemplo, a recaptação do cálcio do citosol para dentro do retículo endoplasmático.

Nesse sentido, vários mecanismos contribuem para uma alteração na recaptação de cálcio, incluindo mecanismos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático (LEVITSKY *et al.* 1993; CORTES *et al.* 1997; LOMPRES 1999) e alterações na sinalização em condições de depleção do retículo, o que leva à ativação de canais de cálcio de membrana plasmática (LIOU *et al.* 2005; ROOS *et al.* 2005). Nossos resultados evidenciaram que a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase com a tapsigargina foi capaz de restaurar a contração induzida pela fenilefrina, mas não pela cafeína. Ao que nos parece a quantidade de cálcio que não é recaptada e permanece no citosol após o estímulo dos receptores  $\text{IP}_3$  é suficiente, após estímulo por fenilefrina, para restaurar a contração induzida por esse agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico em aortas *high salt*. Por isso avaliamos a mobilização de cálcio em células musculares lisas isoladas de artérias aortas. Os resultados desse experimento demonstraram menor quantidade de cálcio intracelular em células no repouso assim como uma redução nos níveis de cálcio liberado pelo retículo endoplasmático quando as células foram estimuladas com ATP. Depois da depleção dos estoques intracelulares de cálcio, a célula foi exposta ao PSS normal para que o retículo endoplasmático fosse recarregado e então, novamente estimulado com ATP. Nessa situação a quantidade de cálcio liberada foi ainda menor do que aquela observada no primeiro estímulo. Esse dado é de suma importância, pois nos sugeriu que as alterações observadas na contração induzida por fenilefrina ou cafeína provavelmente estariam relacionadas com a redução na recaptação do cálcio para dentro do retículo endoplasmático.

Nesse ínterim verificamos que aortas de animais expostos à dieta com altas concentrações de NaCl tiveram redução na expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase tipo 2 (SERCA2) e tipo 3 (SERCA3), o que certamente comprometeu a recaptação de cálcio para dentro do retículo endoplasmático. Essas bombas (SERCAs) podem ser reguladas por fosfolambam, que inibe as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, quando está em sua forma não fosforilada, mas não quando fosforilada por proteína quinase dependente de cAMP (KIRCHBERGER *et al.* 1974; TADA *et al.* 1975), proteína quinase dependente da  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CAMK) (LE PEUCH *et al.* 1979), ou proteína quinase C (MOVSESIAN *et al.* 1984). Nossos experimentos revelaram

que aortas isoladas de ratos do grupo *high salt*, tiveram uma tendência a aumentar a expressão de fosfolambam, apesar de não serem estatisticamente significantes. A maior expressão de fosfolambam pode também ter contribuído para reduzir a atividade das SERCAs. Em conjunto esses resultados nos permitem dizer que a expressão e provavelmente a atividade das SERCAs em células musculares lisas de artérias aorta de animais expostos à dieta *high salt* estão reduzidas e comprometem a recaptação do cálcio para dentro do retículo endoplasmático.

Apesar de todos os resultados obtidos, ainda precisávamos confirmar a menor recaptação de cálcio de modo funcional. Para isso artérias mesentéricas de resistência, foram submetidas à contração induzida por  $\text{CaCl}_2$  em meio livre de cálcio e observamos que os vasos provenientes de ratos do grupo *high salt* contraíram mais do que artérias de ratos controle. Isso porque o cálcio adicionado à preparação que entrou na célula provavelmente tenha permanecido no meio citosólico em maiores quantidades fazendo com que os anéis de artérias mesentéricas contraíssem mais. Por outro lado, a incubação da tapsigargina, fez com que as respostas contráteis fossem semelhantes em ambos os grupos. Acreditamos que esse efeito esteja relacionado com a ação da tapsigargina em inibir a recaptação do cálcio, fazendo com que as concentrações desse íon fossem mais elevadas no citosol das células de ambos os grupos. Entretanto, nas artérias do grupo exposto à dieta *high salt* com densidade de SERCAs reduzido, a tapsigargina não foi capaz de alterar a contração, mas nas artérias do grupo controle, com expressão normal das  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, o inibidor dessa bomba, aumentou a contração das artérias controle em virtude da maior concentração de cálcio no citosol causada pela não recaptação, de modo semelhante ao que ocorre em vasos de ratos *high salt*.

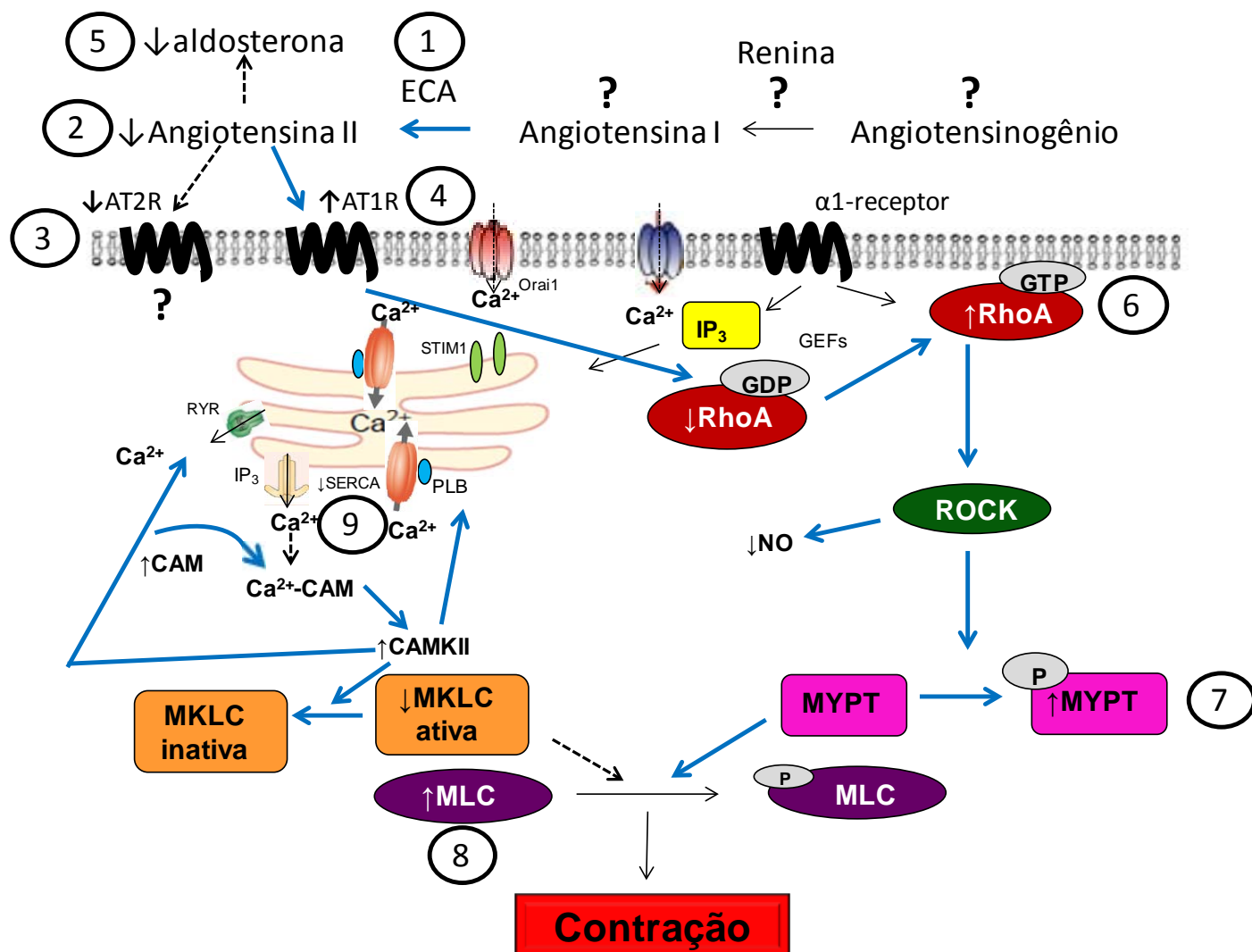
O cálcio, no citosol, complexa-se com a calmodulina e participa de várias funções celulares (CHIN e MEANS 2000). Após a ligação do cálcio, a calmodulina aumenta a afinidade para um grande número de proteínas ligantes, incluindo a calmodulina quinase (CAMKI, II e IV) (HOOK e MEANS 2001), também conhecida como proteína quinase dependente da  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. Atualmente é considerado que a CAMKII pode desempenhar papel importante na regulação da contratilidade do músculo liso vascular (KIM *et al.* 2000). Vários estudos sugerem



que a CAMKII pode modular a sensibilidade do aparelho contrátil ao cálcio por ambos: i) fosforilação da MLCK, consequentemente causando uma desensibilização à  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (TANSEY *et al.* 1992) ou, ii) por fosforilação direta da MLC, levando à sensibilização à  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (EDELMAN *et al.* 1990). Mais recentemente foi demonstrado que a força de contração de células musculares lisas de aorta de furão tem um componente dependente da CAMKII, pois a inibição dessa quinase leva à redução da contração (KIM *et al.* 2000). Nossos estudos demonstraram que ratos jovens expostos à dieta *high salt* tem um aumento na expressão da calmodulina. Especulamos que isso esteja relacionado com a menor quantidade de cálcio liberada do retículo endoplasmático, que faz com que as células passem a expressar mais essa proteína na tentativa de compensar os baixos níveis de cálcio liberado. Esse resultado foi acompanhado por um aumento na expressão de CAMKII, que pode atuar no sentido de fosforilar a MLC induzindo contração. Observando isso e, considerando a maior atividade da via RhoA/ROCK era de se esperar que a fosforilação da MLC estivesse aumentada. Apesar disso, não observamos alteração nos níveis de MLC fosforilada, provavelmente porque a CAMKII também causa inativação da MLCK, consequentemente inibindo a ativação da MLC. Corroborando esses dados a expressão da MLCK foi diminuída em artérias aorta de ratos *high salt* o que pode atuar como uma espécie de freio para reduzir a fosforilação da MLC, mesmo que haja um excesso de substrato. Esse conjunto de fatores pode contribuir para a manutenção da responsividade dos vasos de animais *high salt* próxima àquela mensurada em preparações controle.

A dieta *high salt* desde as idades iniciais da vida dos animais foi capaz de causar alterações no sistema cardiovascular, especialmente no balanço de constituintes contráteis do músculo liso vascular. Por fim, a Figura 36 ilustra as principais modificações encontradas nos ratos, expostos a dieta *high salt*. A exposição prolongada dos animais à dieta *high salt* induziu maior responsividade para a angiotensina I, o que no grupo NaCl 8% envolveu o aumento da atividade da ECA, assim como maior responsividade para angiotensina II, relacionada com o aumento na expressão dos receptores AT1 e redução dos receptores AT2. Além disso, os vasos de resistência e de condutância de ratos expostos à dieta *high salt* apresentaram maior atividade da via RhoA/ROCK, evidenciada pela maior

translocação da RhoA para a membrana plasmática e pelos maiores níveis de p-MYPT1, o que denota redução na atividade da miosina fosfatase, contribuindo para a manutenção da MLC na forma fosforilada. Em contrapartida nas aortas desses animais expostos a dieta *high salt* observamos redução na expressão da MLCK, o que parece estar atuando como uma espécie de freio controlando a fosforilação da MLC. A redução da MLCK provavelmente esteja ligada à maior expressão de CAMKII, responsável por inativar a MLCK e certamente está compensando a inibição da miosina fosfatase. A dieta *high salt* também reduziu a recaptação de cálcio para o retículo endoplasmático, o que culminou com menor liberação desse cálcio para o meio citosólico nas células musculares lisas de aorta, que pode ter contribuído para aumentar a expressão de calmodulina. Sugerimos que a dieta *high salt*, desde o desmame até a idade adulta dos ratos, induziu uma alteração nos mecanismos de controle da contratilidade vascular, entretanto a maquinaria contrátil, através de mecanismos compensatórios manteve os níveis pressóricos inalterados. As mudanças observadas não são suficientes para o desenvolvimento de um quadro de hipertensão em ratos jovens, porém podem contribuir de forma significativa para o aparecimento precoce dessa doença em fases mais tardias de vida do indivíduo. Esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de terapias inovadoras para a hipertensão, ou até mesmo para a implementação de estratégias que visem interromper a sequência de eventos que levam à instalação da hipertensão.



**Figura 36: Principais alterações funcionais e moleculares induzidas por dieta *high salt* em vasos.** Ratos expostos à dieta com NaCl tem: **1)** maior atividade da ECA (NaCl 8%); **2)** Diminuição dos níveis de angiotensina II; **3)** Redução da expressão dos receptores AT2 em aorta; **4)** Aumento da expressão de receptores AT1 em aorta; **5)** Redução dos níveis circulantes de aldosterona; Esse conjunto de alterações no SRAA contribuiu para o aumento da responsividade para angiotensina I e II observado em nossos experimentos. Apesar de não termos verificado o SRA depois da ativação dos respectivos receptores, a literatura nos mostra que a ativação de receptores AT1 leva à ativação da via RhoA/ROCK (**6**) e consequentemente, maior inativação da miosina fosfatase, evidenciada pela maior expressão da MYPT1 fosforilada (**7**). Além disso, ocorreu um aumento da expressão de MLC (**8**), sem modificar sua fosforilação. Observou-se ainda, que o influxo de cálcio não foi modificado, mas a recaptação de cálcio para o retículo endoplasmático foi diminuída devido a redução na expressão das SERCAs (**9**). Há um aumento na densidade da calmodulina e CAMKII acompanhada da redução da MLCK. Todos esses fatores atuando para a manutenção da responsividade vascular. Além disso, a CAMKII também pode fosforilar fosfolambam e receptores de rianodina. AT1R: receptor tipo AT1 para angiotensina II; AT2R: receptor tipo AT2 para angiotensina II; ECA: enzima conversora de angiotensina; NO: óxido nítrico; GDP: difosfato de

guanosina; GTP: trifosfato de guanosina; ROCK: Rho quinase; IP3: trifosfato de inositol; MLC: cadeia leve de miosina; p-MLC: cadeia leve de miosina fosforilada; MLCK: quinase de cadeia leve de miosina (ativa); p-MLCK: quinase de cadeia leve de miosina fosforilada (inativa); MYPT1: sitio de ligação da miosina fosfatase ativa; p-MYPT1: sítio de ligação da miosina fosfatase fosforilada (inativa); CAM: calmodulina; CAMKII: proteína quinase dependente da calmodulina II; RYR: receptor de rianodina; SERCA: bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; GEFs: fator trocador de nucleotídeo guanina; PLB: fosfolambam. As setas em azul indicam as partes da via que foram estimuladas pela dieta *high salt*; as setas pontilhadas indicam redução e as setas contínuas em preto representam mecanismos que não foram alterados ou não foram estudados.

## VII - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com ratos *Wistar* normotensos expostos à dieta *high salt* desde o desmame até a idade adulta nos permitem afirmar que:

- I. Esses ratos responderam menos à acetilcolina, mas não ao nitroprussiato de sódio, administrados pela via intravenosa. Esse efeito pode estar relacionado com os baixos níveis de NO observados no plasma dos ratos NaCl 8%;
- II. Ratos expostos à dieta *high salt* demonstraram maior responsividade para angiotensina I *in vivo*. Efeito que pode estar relacionado, pelo menos no grupo NaCl 8%, com o aumento da atividade da ECA plasmática. O aumento da responsividade para a angiotensina II parece ser mediado pela redução da expressão de receptores AT2 e aumento da expressão de receptores AT1 e estes podem modular ou serem modulados pelos baixos níveis de angiotensina II e aldosterona observados no plasma;
- III. Artérias aorta oriundas de ratos submetidos à dieta *high salt* apresentam aumento da atividade da via RhoA/ROCK, evidenciada pela maior translocação da RhoA do citosol para a membrana plasmática e pela maior fosforilação da MYPT1;
- IV. Apesar do influxo de cálcio não ter sido alterado, células musculares lisas de ratos expostos à dieta *high salt* tiveram quantidades menores de cálcio intracelular. Esse efeito parece estar relacionado com a redução na expressão das SERCAs, o que acarreta menos cálcio recaptado para dentro do retículo endoplasmático e conseqüentemente menor liberação desse íon;
- V. Artérias aorta obtidas de ratos expostos à dieta *high salt* tiveram aumento na expressão de calmodulina e CAMKII, a qual parece ter reduzido a densidade de MLCK. Isso pode ter contribuído para a não fosforilação da MLC;
- VI. Em conjunto nossos resultados demonstraram que a dieta *high salt* induziu uma alteração nos mecanismos reguladores da contração: maior atividade da via RhoA/ROCK com inibição da miosina fosfatase contrabalanceada com inibição na via de transdução do cálcio intracelular, ambos contribuindo para a manutenção da responsividade vascular.

## VIII- PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos com esse estudo são de fundamental importância para a compreensão dos efeitos funcionais e moleculares induzidos por altas quantidades de sal na dieta de indivíduos desde a fase inicial da vida até a idade adulta jovem. Apesar disso algumas questões adicionais ainda precisam ser respondidas:

- I. O que faz com que a RhoA/ROCK se torne mais ativa? Será que o sal *per se* é capaz de causar esse efeito, ou o sal altera algo anterior que leva à maior atividade da RhoA/ROCK?
- II. O que causa a redução na expressão das SERCAs e consequente diminuição na recaptação de cálcio?
- III. A longo prazo, que consequências poderão sofrer as células por estarem armazenando menos cálcio?
- IV. Até quando esse balanço entre RhoA/ROCK e cálcio poderá evitar a hipertensão? O que fará com que esse balanço seja interrompido?

Sendo assim, estudos posteriores serão necessários para esclarecer estes questionamentos e contribuir para melhor compreensão acerca dos mecanismos pelos quais o excesso de sal pode alterar a homeostasia vascular e levar a complicações cardiovasculares.

## IX - REFERÊNCIAS

- ADEGUNLOYE, B. J. e SOFOLA, O. A. (1997). "Effect of dietary salt loading and high-calcium diet on vascular smooth muscle responses and endothelium function in rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**(11): 814-818.
- AGAPITOV, A. V. e HAYNES, W. G. (2002). "Role of endothelin in cardiovascular disease." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **3**(1): 1-15.
- AGUILERA, G. e CATT, K. (1981). "Regulation of vascular angiotensin II receptors in the rat during altered sodium intake." *Circ Res* **49**(3): 751-758.
- ALDERMAN, M. H. (2007). "Presidential Address: 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension: dietary sodium and cardiovascular disease: the 'J'-shaped relation." *J Hypertens* **25**(5): 903-907.
- ALI, F., GUGLIN, M., VAITKEVICIUS, P. e GHALI, J. K. (2007). "Therapeutic potential of vasopressin receptor antagonists." *Drugs* **67**(6): 847-858.
- AMANO, M., FUKATA, Y. e KAIBUCHI, K. (2000). "Regulation and functions of Rho-associated kinase." *Exp Cell Res* **261**(1): 44-51.
- ANAVEKAR, N. S., MCMURRAY, J. J., VELAZQUEZ, E. J., SOLOMON, S. D., KOBER, L., ROULEAU, J. L., WHITE, H. D., NORDLANDER, R., MAGGIONI, A., DICKSTEIN, K., ZELENKOFSKE, S., LEIMBERGER, J. D., CALIFF, R. M. e PFEFFER, M. A. (2004). "Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction." *N Engl J Med* **351**(13): 1285-1295.
- ARDAILLOU, R. (1999). "Angiotensin II receptors." *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**: S30-39.
- ARII, T., OHYANAGI, M., SHIBUYA, J. e IWASAKI, T. (1999). "Increased function of the voltage-dependent calcium channels, without increase of Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum in the arterioles of spontaneous hypertensive rats." *Am J Hypertens* **12**(12 Pt 1-2): 1236-1242.
- ASANO, M. e NOMURA, Y. (2003). "Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats." *Hypertens Res* **26**(1): 97-106.
- ASHIDA, T., KAWANO, Y., YOSHIMI, H., KURAMOCHI, M. e OMAE, T. (1992). "Effects of dietary salt on sodium-calcium exchange and ATP-driven calcium pump in arterial smooth muscle of Dahl rats." *J Hypertens* **10**(11): 1335-1341.
- BAYORH, M. A., GANAFI, A. A., EMMETT, N., SOCCI, R. R., EATMAN, D. e FRIDIE, I. L. (2005). "Alterations in aldosterone and angiotensin II levels in salt-induced hypertension." *Clin Exp Hypertens* **27**(4): 355-367.

BENDHACK, L. M., SHARMA, R. V. e BHALLA, R. C. (1992). "Altered signal transduction in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* **19**(2 Suppl): II142-148.

BERRIDGE, M. J. (1993). "Cell signalling. A tale of two messengers." *Nature* **365**(6445): 388-389.

BODIN, P., TRAVO, C., STOCLET, J. C. e TRAVO, P. (1993). "High sensitivity of hypertensive aortic myocytes to norepinephrine and angiotensin." *Am J Physiol* **264**(2 Pt 1): C441-445.

BOEGEHOLD, M. A. (1993). "Effect of dietary salt on arteriolar nitric oxide in striated muscle of normotensive rats." *Am J Physiol* **264**(6 Pt 2): H1810-1816.

BOLZ, S. S., VOGEL, L., SOLLINGER, D., DERWAND, R., DE WIT, C., LOIRAND, G. e POHL, U. (2003). "Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway." *Circulation* **107**(24): 3081-3087.

BOUHNICK, J., RICHOUX, J. P., HUANG, H., SAVOIE, F., BAUSSANT, T., ALHENC-GELAS, F. e CORVOL, P. (1992). "Hypertension in Dahl salt-sensitive rats: biochemical and immunohistochemical studies." *Clin Sci (Lond)* **83**(1): 13-22.

BRUNDTLAND, G. H. (2002). "From the World Health Organization. Reducing risks to health, promoting healthy life." *JAMA* **288**(16): 1974.

BRUNNER, F., BRAS-SILVA, C., CERDEIRA, A. S. e LEITE-MOREIRA, A. F. (2006). "Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis." *Pharmacol Ther* **111**(2): 508-531.

CAREY, R. M. (1999). "Angiotensin receptors and the kidney." *Curr Hypertens Rep* **1**(2): 117.

CARLSON, S. H., SHELTON, J., WHITE, C. R. e WYSS, J. M. (2000). "Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats." *Hypertension* **35**(1 Pt 2): 403-408.

CARRETERO, O. A. e OPARIL, S. (2000). "Essential hypertension. Part I: definition and etiology." *Circulation* **101**(3): 329-335.

CHIN, D. e MEANS, A. R. (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." *Trends Cell Biol* **10**(8): 322-328.

CHOBANIAN, A. V., BAKRIS, G. L., BLACK, H. R., CUSHMAN, W. C., GREEN, L. A., IZZO, J. L., JR., JONES, D. W., MATERSON, B. J., OPARIL, S., WRIGHT, J. T., JR. e ROCCELLA, E. J. (2003). "Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure." *Hypertension* **42**(6): 1206-1252.



COFFMAN, T. M. (2011). "Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension." *Nat Med* **17**(11): 1402-1409.

CORTES, S. F., LEMOS, V. S. e STOCLET, J. C. (1997). "Alterations in calcium stores in aortic myocytes from spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* **29**(6): 1322-1328.

CRACKOWER, M. A., SARAO, R., OUDIT, G. Y., YAGIL, C., KOZIERADZKI, I., SCANGA, S. E., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J., DA COSTA, J., ZHANG, L., PEI, Y., SCHOLEY, J., FERRARIO, C. M., MANOUKIAN, A. S., CHAPPELL, M. C., BACKX, P. H., YAGIL, Y. e PENNINGER, J. M. (2002). "Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function." *Nature* **417**(6891): 822-828.

CROWLEY, S. D., GURLEY, S. B., HERRERA, M. J., RUIZ, P., GRIFFITHS, R., KUMAR, A. P., KIM, H. S., SMITHIES, O., LE, T. H. e COFFMAN, T. M. (2006). "Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17985-17990.

CROWLEY, S. D., GURLEY, S. B., OLIVERIO, M. I., PAZMINO, A. K., GRIFFITHS, R., FLANNERY, P. J., SPURNEY, R. F., KIM, H. S., SMITHIES, O., LE, T. H. e COFFMAN, T. M. (2005). "Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system." *J Clin Invest* **115**(4): 1092-1099.

DA SILVA-SANTOS, J. E., CHIAO, C. W., LEITE, R. e WEBB, R. C. (2009). "The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxemia in small mesenteric arteries." *Crit Care Med* **37**(5): 1716-1723.

DAVID, F. L., MONTEZANO, A. C., REBOUCAS, N. A., NIGRO, D., FORTES, Z. B., CARVALHO, M. H. e TOSTES, R. C. (2002). "Gender differences in vascular expression of endothelin and ET(A)/ET(B) receptors, but not in calcium handling mechanisms, in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension." *Braz J Med Biol Res* **35**(9): 1061-1068.

DOE, C., BENTLEY, R., BEHM, D. J., LAFFERTY, R., STAVENGER, R., JUNG, D., BAMFORD, M., PANCHAL, T., GRYGIELKO, E., WRIGHT, L. L., SMITH, G. K., CHEN, Z., WEBB, C., KHANDEKAR, S., YI, T., KIRKPATRICK, R., DUL, E., JOLIVETTE, L., MARINO, J. P., JR., WILLETTE, R., LEE, D. e HU, E. (2007). "Novel Rho kinase inhibitors with anti-inflammatory and vasodilatory activities." *J Pharmacol Exp Ther* **320**(1): 89-98.

DOS SANTOS, L., GONCALVES, M. V., VASSALLO, D. V., OLIVEIRA, E. M. e ROSSONI, L. V. (2006). "Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation." *Life Sci* **78**(19): 2272-2279.

DUNCAN, B. B., STEVENS, A., ISER, B.P. M., MALTA, D.C., SILVA, G. A., SCHMIDT, M. I. (2010). Mortalidade por doenças crônicas no Brasil: situação em

2009 e tendências de 1991 a 2009. Saúde Brasil, 2010. Brasília, DF, Ministério da Saúde: 118-134.

EDELMAN, A. M., LIN, W. H., OSTERHOUT, D. J., BENNETT, M. K., KENNEDY, M. B. e KREBS, E. G. (1990). "Phosphorylation of smooth muscle myosin by type II  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase." *Mol Cell Biochem* **97**(1): 87-98.

ELTON, T. S., STEPHAN, C. C., TAYLOR, G. R., KIMBALL, M. G., MARTIN, M. M., DURAND, J. N. e OPARIL, S. (1992). "Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes." *Biochem Biophys Res Commun* **184**(2): 1067-1073.

FAILLI, P., ALFARANO, C., FRANCHI-MICHELI, S., MANNUCCI, E., CERBAI, E., MUGELLI, A. e RAIMONDI, L. (2009). "Losartan counteracts the hyper-reactivity to angiotensin II and ROCK1 over-activation in aortas isolated from streptozotocin-injected diabetic rats." *Cardiovasc Diabetol* **8**: 32.

FELETOU, M. e VANHOUTTE, P. M. (1988). "Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle." *Br J Pharmacol* **93**(3): 515-524.

FORTES, Z. B., NIGRO, D., SCIVOLETTO, R. e DE CARVALHO, M. H. (1990). "Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor released in arterioles of deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats." *J Hypertens* **8**(11): 1043-1048.

FRANK, G. D. e EGUCHI, S. (2003). "Activation of tyrosine kinases by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: significance and involvement of EGF receptor transactivation by angiotensin II." *Antioxid Redox Signal* **5**(6): 771-780.

FRISBEE, J. C. e LOMBARD, J. H. (1999). "Acute elevations in salt intake and reduced renal mass hypertension compromise arteriolar dilation in rat cremaster muscle." *Microvasc Res* **57**(3): 273-283.

FRISBEE, J. C. e LOMBARD, J. H. (1999). "Development and reversibility of altered skeletal muscle arteriolar structure and reactivity with high salt diet and reduced renal mass hypertension." *Microcirculation* **6**(3): 215-225.

FU-XIANG, D., JAMESON, M., SKOPEC, J., DIEDERICH, A. e DIEDERICH, D. (1992). "Endothelial dysfunction of resistance arteries of spontaneously hypertensive rats." *J Cardiovasc Pharmacol* **20 Suppl 12**: S190-192.

FUNDER, J. W. (2002). "New biology of aldosterone, and experimental studies on the selective aldosterone blocker eplerenone." *Am Heart J* **144**(5 Suppl): S8-11.

FURCHGOTT, R. F. e ZAWADZKI, J. V. (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* **288**(5789): 373-376.

GABOR, A. e LEENEN, F. H. (2012). "Cardiovascular effects of angiotensin II and glutamate in the PVN of Dahl salt-sensitive rats." *Brain Res* **1447**: 28-37.

GHISDAL, P., VANDENBERG, G. e MOREL, N. (2003). "Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries." *J Physiol* **551**(Pt 3): 855-867.

GIACHINI, F. R., CHIAO, C. W., CARNEIRO, F. S., LIMA, V. V., CARNEIRO, Z. N., DORRANCE, A. M., TOSTES, R. C. e WEBB, R. C. (2009). "Increased activation of stromal interaction molecule-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats: a novel insight into vascular dysfunction." *Hypertension* **53**(2): 409-416.

GONG, M. C., FUJIHARA, H., SOMLYO, A. V. e SOMLYO, A. P. (1997). "Translocation of rhoA associated with Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle." *J Biol Chem* **272**(16): 10704-10709.

GONZALEZ, M., LOBOS, L., CASTILLO, F., GALLEGUILLOS, L., LOPEZ, N. C. e MICHEA, L. (2005). "High-salt diet inhibits expression of angiotensin type 2 receptor in resistance arteries." *Hypertension* **45**(5): 853-859.

GRIM, C. E., LUFT, F. C., MILLER, J. Z., MENEELY, G. R., BATTARBEE, H. D., HAMES, C. G. e DAHL, L. K. (1980). "Racial differences in blood pressure in Evans County, Georgia: relationship to sodium and potassium intake and plasma renin activity." *J Chronic Dis* **33**(2): 87-94.

GU, V. Y., WONG, M. H., STEVENSON, J. L., CRAWFORD, K. E., BRENNECKE, S. P. e GUDE, N. M. (2008). "Calreticulin in human pregnancy and pre-eclampsia." *Mol Hum Reprod* **14**(5): 309-315.

GUILD, S. B., JENKINSON, S. e MUIR, T. C. (1992). "Noradrenaline-stimulated inositol phosphate accumulation in arteries from spontaneously-hypertensive rats." *Br J Pharmacol* **106**(4): 859-864.

GURLEY, S. B., RIQUEIR-BRISON, A. D., SCHNERMANN, J., SPARKS, M. A., ALLEN, A. M., HAASE, V. H., SNOUWAERT, J. N., LE, T. H., MCDONOUGH, A. A., KOLLER, B. H. e COFFMAN, T. M. (2011). "AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure." *Cell Metab* **13**(4): 469-475.

GUYENET, P. G. (2006). "The sympathetic control of blood pressure." *Nat Rev Neurosci* **7**(5): 335-346.

GUYTON, A. C. (1991). "Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids." *Science* **252**(5014): 1813-1816.

HADDOCK, R. E. e HILL, C. E. (2002). "Differential activation of ion channels by inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)- and ryanodine-sensitive calcium stores in rat basilar artery vasomotion." *J Physiol* **545**(Pt 2): 615-627.

HIGUCHI, S., OHTSU, H., SUZUKI, H., SHIRAI, H., FRANK, G. D. e EGUCHI, S. (2007). "Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology." *Clin Sci (Lond)* **112**(8): 417-428.

HILGERS, R. H., TODD, J., JR. e WEBB, R. C. (2007). "Increased PDZ-RhoGEF/RhoA/Rho kinase signaling in small mesenteric arteries of angiotensin II-induced hypertensive rats." *J Hypertens* **25**(8): 1687-1697.

HILGERS, R. H. e WEBB, R. C. (2005). "Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho." *Exp Biol Med* (Maywood) **230**(11): 829-835.

HISAYAMA, T. e TAKAYANAGI, I. (1988). "Ryanodine: its possible mechanism of action in the caffeine-sensitive calcium store of smooth muscle." *Pflugers Arch* **412**(4): 376-381.

HODGE, G., YE, V. Z. e DUGGAN, K. A. (2002). "Dysregulation of angiotensin II synthesis is associated with salt sensitivity in the spontaneous hypertensive rat." *Acta Physiol Scand* **174**(3): 209-215.

HOOK, S. S. e MEANS, A. R. (2001). "Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 471-505.

HUANG, B. S. e LEENEN, F. H. (1998). "Both brain angiotensin II and "ouabain" contribute to sympathoexcitation and hypertension in Dahl S rats on high salt intake." *Hypertension* **32**(6): 1028-1033.

HUANG, B. S., WANG, H. e LEENEN, F. H. (2001). "Enhanced sympathoexcitatory and pressor responses to central Na<sup>+</sup> in Dahl salt-sensitive vs. -resistant rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(5): H1881-1889.

HUTCHINSON, P. J., PALMER, R. M. e MONCADA, S. (1987). "Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips." *Eur J Pharmacol* **141**(3): 445-451.

IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E. e CHAUDHURI, G. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9265-9269.

ISHIKAWA, Y., NISHIKIMI, T., AKIMOTO, K., ISHIMURA, K., ONO, H. e MATSUOKA, H. (2006). "Long-term administration of rho-kinase inhibitor ameliorates renal damage in malignant hypertensive rats." *Hypertension* **47**(6): 1075-1083.

ITO, S. e CARRETERO, O. A. (1992). "Impaired response to acetylcholine despite intact endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide in isolated microperfused afferent arterioles of the spontaneously hypertensive rat." *J Cardiovasc Pharmacol* **20 Suppl 12**: S187-189.

IWAMOTO, T., KITA, S. e KATSURAGI, T. (2005). "Salt-sensitive hypertension, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, and vascular smooth muscle." *Trends Cardiovasc Med* **15**(8): 273-277.

IZAWA, Y., YOSHIZUMI, M., FUJITA, Y., ALI, N., KANEMATSU, Y., ISHIZAWA, K., TSUCHIYA, K., OBATA, T., EBINA, Y., TOMITA, S. e TAMAKI, T. (2005).

"ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells." *Exp Cell Res* **308**(2): 291-299.

JACOB, H. J. (1999). "Physiological genetics: application to hypertension research." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(7): 530-535.

JAFFE, I. Z. e MENDELSON, M. E. (2005). "Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells." *Circ Res* **96**(6): 643-650.

JAGGAR, J. H. (2001). "Intravascular pressure regulates local and global Ca(2+) signaling in cerebral artery smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(2): C439-448.

JIN, L., YING, Z., HILGERS, R. H., YIN, J., ZHAO, X., IMIG, J. D. e WEBB, R. C. (2006). "Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats." *J Pharmacol Exp Ther* **318**(1): 288-295.

JIN, N., PACKER, C. S., ENGLISH, D. e RHOADES, R. A. (1993). "Inositol trisphosphate is involved in norepinephrine- but not in hypoxia-induced pulmonary arterial contraction." *Am J Physiol* **264**(2 Pt 1): L160-164.

JOHANSSON, M. E., BERNBERG, E., ANDERSSON, I. J., BIE, P., SKOTT, O., GAN, L. M. e BERGSTROM, G. (2009). "High-salt diet combined with elevated angiotensin II accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *J Hypertens* **27**(1): 41-47.

KAIBUCHI, K., KURODA, S. e AMANO, M. (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." *Annu Rev Biochem* **68**: 459-486.

KAKAR, P. e LIP, G. Y. (2006). "Towards understanding the aetiology and pathophysiology of human hypertension: where are we now?" *J Hum Hypertens* **20**(11): 833-836.

KAMBAYASHI, Y., BARDHAN, S., TAKAHASHI, K., TSUZUKI, S., INUI, H., HAMAKUBO, T. e INAGAMI, T. (1993). "Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition." *J Biol Chem* **268**(33): 24543-24546.

KANNEL, W. B. (2000). "Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor." *Am J Cardiol* **85**(2): 251-255.

KATHOLI, R. E., NAFTILAN, A. J. e OPARIL, S. (1980). "Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in the rat." *Hypertension* **2**(3): 266-273.

KATORI, M. e MAJIMA, M. (2006). "A missing link between a high salt intake and blood pressure increase." *J Pharmacol Sci* **100**(5): 370-390.

KAU, S. T., KEDDIE, J. R. e ANDREWS, D. (1984). "A method for screening diuretic agents in the rat." *J Pharmacol Methods* **11**(1): 67-75.

KEARNEY, P. M., WHELTON, M., REYNOLDS, K., MUNTNER, P., WHELTON, P. K. e HE, J. (2005). "Global burden of hypertension: analysis of worldwide data." *Lancet* **365**(9455): 217-223.

KIM, I., JE, H. D., GALLANT, C., ZHAN, Q., ROPER, D. V., BADWEY, J. A., SINGER, H. A. e MORGAN, K. G. (2000). "Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II-dependent activation of contractility in ferret aorta." *J Physiol* **526 Pt 2**: 367-374.

KIMURA, K., ITO, M., AMANO, M., CHIHARA, K., FUKATA, Y., NAKAFUKU, M., YAMAMORI, B., FENG, J., NAKANO, T., OKAWA, K., IWAMATSU, A. e KAIBUCHI, K. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *Science* **273**(5272): 245-248.

KIRCHBERGER, M. A., TADA, M. e KATZ, A. M. (1974). "Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **249**(19): 6166-6173.

KOKUBU, N., SATOH, M. e TAKAYANAGI, I. (1995). "Involvement of botulinum C3-sensitive GTP-binding proteins in alpha 1-adrenoceptor subtypes mediating Ca(2+)-sensitization." *Eur J Pharmacol* **290**(1): 19-27.

KU, Y. H. (2006). "Role of limbic peptidergic circuits in regulation of arterial pressure, relevant to development of essential hypertension." *Neuropeptides* **40**(5): 299-308.

LARA, L. S., MCCORMACK, M., SEMPRUM-PRIETO, L. C., SHENOUDA, S., MAJID, D. S., KOBORI, H., NAVAR, L. G. e PRIETO, M. C. (2012). "AT1 receptor-mediated augmentation of angiotensinogen, oxidative stress, and inflammation in ANG II-salt hypertension." *Am J Physiol Renal Physiol* **302**(1): F85-94.

LAW, M., WALD, N. e MORRIS, J. (2003). "Lowering blood pressure to prevent myocardial infarction and stroke: a new preventive strategy." *Health Technol Assess* **7**(31): 1-94.

LAWES, C. M., VANDER HOORN, S. e RODGERS, A. (2008). "Global burden of blood-pressure-related disease, 2001." *Lancet* **371**(9623): 1513-1518.

LE CORVOISIER, P., ADAMY, C., SAMBIN, L., CROZATIER, B., BERDEAUX, A., MICHEL, J. B., HITTINGER, L. e SU, J. (2010). "The cardiac renin-angiotensin system is responsible for high-salt diet-induced left ventricular hypertrophy in mice." *Eur J Heart Fail* **12**(11): 1171-1178.

LE PEUCH, C. J., HAIECH, J. e DEMAILLE, J. G. (1979). "Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations." *Biochemistry* **18**(23): 5150-5157.

LEE, C. R., WATKINS, M. L., PATTERSON, J. H., GATTIS, W., O'CONNOR C, M., GHEORGHIAD, M. e ADAMS, K. F., JR. (2003). "Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure." *Am Heart J* **146**(1): 9-18.

LEMARIE, C. A., PARADIS, P. e SCHIFFRIN, E. L. (2008). "New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone." *J Mol Med (Berl)* **86**(6): 673-678.

LEUNG, T., CHEN, X. Q., MANSER, E. e LIM, L. (1996). "The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5313-5327.

LEUNG, T., MANSER, E., TAN, L. e LIM, L. (1995). "A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes." *J Biol Chem* **270**(49): 29051-29054.

LEVITSKY, D. O., CLERGUE, M., LAMBERT, F., SOUPONITSKAYA, M. V., LE JEMTEL, T. H., LECARPENTIER, Y. e LOMPRES, A. M. (1993). "Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca(2+)-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats." *J Biol Chem* **268**(11): 8325-8331.

LI, H., WEATHERFORD, E. T., DAVIS, D. R., KEEN, H. L., GROBE, J. L., DAUGHERTY, A., CASSIS, L. A., ALLEN, A. M. e SIGMUND, C. D. (2011). "Renal proximal tubule angiotensin AT1A receptors regulate blood pressure." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**(4): R1067-1077.

LIANG, B. e LEENEN, F. H. (2008). "Prevention of salt-induced hypertension and fibrosis by AT1-receptor blockers in Dahl S rats." *J Cardiovasc Pharmacol* **51**(5): 457-466.

LIFTON, R. P., GHARAVI, A. G. e GELLER, D. S. (2001). "Molecular mechanisms of human hypertension." *Cell* **104**(4): 545-556.

LIU, J., KIM, M. L., HEO, W. D., JONES, J. T., MYERS, J. W., FERRELL, J. E., JR. e MEYER, T. (2005). "STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx." *Curr Biol* **15**(13): 1235-1241.

LIU, Y., RUSCH, N. J. e LOMBARD, J. H. (1999). "Loss of endothelium and receptor-mediated dilation in pial arterioles of rats fed a short-term high salt diet." *Hypertension* **33**(2): 686-688.

LOIRAND, G., GUERIN, P. e PACAUD, P. (2006). "Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology." *Circ Res* **98**(3): 322-334.

LOMPRES, A. M. (1999). "Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(7): 553-557.

LUCCHESI, P. A., BELL, J. M., WILLIS, L. S., BYRON, K. L., CORSON, M. A. e BERK, B. C. (1996). "Ca(2+)-dependent mitogen-activated protein kinase

activation in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle defines a hypertensive signal transduction phenotype." *Circ Res* **78**(6): 962-970.

LUSCHER, T. F., AARHUS, L. L. e VANHOUTTE, P. M. (1990). "Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat." *Am J Hypertens* **3**(1): 55-58.

MALLAT, Z., GOJOVA, A., SAUZEAU, V., BRUN, V., SILVESTRE, J. S., ESPOSITO, B., MERVAL, R., GROUX, H., LOIRAND, G. e TEDGUI, A. (2003). "Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice." *Circ Res* **93**(9): 884-888.

MAR, J. e RODRIGUEZ-ARTALEJO, F. (2001). "Which is more important for the efficiency of hypertension treatment: hypertension stage, type of drug or therapeutic compliance?" *J Hypertens* **19**(1): 149-155.

MASUMOTO, A., HIROOKA, Y., SHIMOKAWA, H., HIRONAGA, K., SETOGUCHI, S. e TAKESHITA, A. (2001). "Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans." *Hypertension* **38**(6): 1307-1310.

MATHERS, C. D. e LONCAR, D. (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." *PLoS Med* **3**(11): e442.

MATROUGUI, K., LOUFRANI, L., HEYMES, C., LEVY, B. I. e HENRION, D. (1999). "Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries." *Hypertension* **34**(4 Pt 1): 659-665.

MATSUMURA, Y., KITA, S. e OKUI, T. (2001). "Mechanisms of endothelin-1-induced potentiation of noradrenaline response in rat mesenteric artery." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**(7): 540-544.

MCDONOUGH, A. A., LEONG, P. K. e YANG, L. E. (2003). "Mechanisms of pressure natriuresis: how blood pressure regulates renal sodium transport." *Ann N Y Acad Sci* **986**: 669-677.

MENETON, P., JEUNEMAITRE, X., DE WARDENER, H. E. e MACGREGOR, G. A. (2005). "Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases." *Physiol Rev* **85**(2): 679-715.

MICHEL, C. C. (1998). "Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability." *J Mol Cell Cardiol* **30**(12): 2541-2546.

MILLER, V. M. e VANHOUTTE, P. M. (1985). "Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase." *Am J Physiol* **248**(4 Pt 2): H432-437.

MING, X. F., VISWAMBHARAN, H., BARANDIER, C., RUFFIEUX, J., KAIBUCHI, K., RUSCONI, S. e YANG, Z. (2002). "Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells." *Mol Cell Biol* **22**(24): 8467-8477.



MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S. e VANE, J. R. (1976). "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." *Nature* **263**(5579): 663-665.

MOSTERD, A., D'AGOSTINO, R. B., SILBERSHATZ, H., SYTKOWSKI, P. A., KANNEL, W. B., GROBBEE, D. E. e LEVY, D. (1999). "Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989." *N Engl J Med* **340**(16): 1221-1227.

MOVSESIAN, M. A., NISHIKAWA, M. e ADELSTEIN, R. S. (1984). "Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake." *J Biol Chem* **259**(13): 8029-8032.

MUKAI, Y., SHIMOKAWA, H., MATOBA, T., KANDABASHI, T., SATOH, S., HIROKI, J., KAIBUCHI, K. e TAKESHITA, A. (2001). "Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension." *FASEB J* **15**(6): 1062-1064.

MUNTZEL, M. e DRUEKE, T. (1992). "A comprehensive review of the salt and blood pressure relationship." *Am J Hypertens* **5**(4 Pt 1): 1S-42S.

NAFTILAN, A. J., PRATT, R. E. e DZAU, V. J. (1989). "Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells." *J Clin Invest* **83**(4): 1419-1424.

NAVAR, L. G., HARRISON-BERNARD, L. M., IMIG, J. D., CERVENKA, L. e MITCHELL, K. D. (2000). "Renal responses to AT1 receptor blockade." *Am J Hypertens* **13**(1 Pt 2): 45S-54S.

NAVAR, L. G., KOBORI, H., PRIETO, M. C. e GONZALEZ-VILLALOBOS, R. A. (2011). "Intratubular renin-angiotensin system in hypertension." *Hypertension* **57**(3): 355-362.

NELSON, M. T., PATLAK, J. B., WORLEY, J. F. e STANDEN, N. B. (1990). "Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone." *Am J Physiol* **259**(1 Pt 1): C3-18.

NICKENIG, G., STREHLOW, K., ROELING, J., ZOLK, O., KNORR, A. e BOHM, M. (1998). "Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo." *Hypertension* **31**(6): 1272-1277.

NIKI, I., YOKOKURA, H., SUDO, T., KATO, M. e HIDAKA, H. (1996). "Ca<sup>2+</sup> signaling and intracellular Ca<sup>2+</sup> binding proteins." *J Biochem* **120**(4): 685-698.

NISHIMURA, J., SAKIHARA, C., ZHOU, Y. e KANAIDE, H. (1996). "Expression of rho A and rho kinase mRNAs in porcine vascular smooth muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **227**(3): 750-754.

NOMURA, Y., ASANO, M., ITO, K., UYAMA, Y., IMAIZUMI, Y. e WATANABE, M. (1997). "Potent vasoconstrictor actions of cyclopiazonic acid and thapsigargin on

femoral arteries from spontaneously hypertensive rats." *Br J Pharmacol* **120**(1): 65-73.

NOON, J. P., RICE, P. J. e BALDESSARINI, R. J. (1978). "Calcium leakage as a cause of the high resting tension in vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(3): 1605-1607.

NURKIEWICZ, T. R. e BOEGEHOLD, M. A. (2007). "High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from nitric oxide synthase." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(4): R1550-1556.

OBIEFUNA, P. C., SOFOLA, O. A. e EBEIGBE, A. B. (1991). "Dietary salt-loading attenuates endothelium-dependent relaxation in response to histamine but not to acetylcholine in rat aortic rings." *Exp Physiol* **76**(1): 135-138.

OPIE, L. H. (1998). *The Heart Physiology, from cell to circulation*. New York, Lippincott-Raven.

ORLOV, S. N. e MONGIN, A. A. (2007). "Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(4): H2039-2053.

PETERSEN, M. C., MUNZENMAIER, D. H. e GREENE, A. S. (2006). "Angiotensin II infusion restores stimulated angiogenesis in the skeletal muscle of rats on a high-salt diet." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(1): H114-120.

PINTEROVA, M., KAREN, P., KUNES, J. e ZICHA, J. (2010). "Role of nifedipine-sensitive sympathetic vasoconstriction in maintenance of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effect of Gi-protein inactivation by pertussis toxin." *J Hypertens* **28**(5): 969-978.

PINTEROVA, M., LISKOVA, S., DOBESOVA, Z., BEHULIAK, M., KUNES, J. e ZICHA, J. (2009). "Impaired control of L-type voltage-dependent calcium channels in experimental hypertension." *Physiol Res* **58 Suppl 2**: S43-54.

PINTO, Y. M., PAUL, M. e GANTEN, D. (1998). "Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering." *Cardiovasc Res* **39**(1): 77-88.

PLATIA, M. P., CATT, K. J., HODGEN, G. D. e AGUILERA, G. (1986). "Regulation of primate angiotensin II receptors during altered sodium intake." *Hypertension* **8**(12): 1121-1126.

POWELL, J. S., CLOZEL, J. P., MULLER, R. K., KUHN, H., HEFTI, F., HOSANG, M. e BAUMGARTNER, H. R. (1989). "Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury." *Science* **245**(4914): 186-188.

PRAKRIYA, M., FESKE, S., GWACK, Y., SRIKANTH, S., RAO, A. e HOGAN, P. G. (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." *Nature* **443**(7108): 230-233.

RAPP, J. P. (2000). "Genetic analysis of inherited hypertension in the rat." *Physiol Rev* **80**(1): 135-172.

RATTMANN, Y. D., TERLUK, M. R., SOUZA, W. M., SANTOS, C. A., BIAVATTI, M. W., TORRES, L. B., MESIA-VELA, S., RIECK, L., DA SILVA-SANTOS, J. E. e MARQUES, M. C. (2005). "Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness." *J Ethnopharmacol* **100**(3): 268-275.

RESINK, T. J., SCOTT-BURDEN, T., BAUR, U., BURGIN, M. e BUHLER, F. R. (1989). "Enhanced responsiveness to angiotensin II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats is not associated with alterations in protein kinase C." *Hypertension* **14**(3): 293-303.

RETTIG, R. e GRISK, O. (2005). "The kidney as a determinant of genetic hypertension: evidence from renal transplantation studies." *Hypertension* **46**(3): 463-468.

RIENTO, K. e RIDLEY, A. J. (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 446-456.

ROBINSON, I. M. e BURGOYNE, R. D. (1991). "Characterisation of distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive calcium stores in digitonin-permeabilised adrenal chromaffin cells." *J Neurochem* **56**(5): 1587-1593.

ROOS, J., DIGREGORIO, P. J., YEROMIN, A. V., OHLSEN, K., LIOUDYNO, M., ZHANG, S., SAFRINA, O., KOZAK, J. A., WAGNER, S. L., CAHALAN, M. D., VELICELEBI, G. e STAUDERMAN, K. A. (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function." *J Cell Biol* **169**(3): 435-445.

SAKURADA, S., OKAMOTO, H., TAKUWA, N., SUGIMOTO, N. e TAKUWA, Y. (2001). "Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(2): C571-578.

SANDBERG, K., JI, H. e CATT, K. J. (1994). "Regulation of angiotensin II receptors in rat brain during dietary sodium changes." *Hypertension* **23**(1 Suppl): I137-141.

SANTOS, R. A., KRIEGER, E. M. e GREENE, L. J. (1985). "An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme." *Hypertension* **7**(2): 244-252.

SATOH, S., UEDA, Y., KOYANAGI, M., KADOKAMI, T., SUGANO, M., YOSHIKAWA, Y. e MAKINO, N. (2003). "Chronic inhibition of Rho kinase blunts the process of left ventricular hypertrophy leading to cardiac contractile dysfunction in hypertension-induced heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **35**(1): 59-70.

SBC/SBH (2010). VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. **13**: 8-11.

SCHIFFRIN, E. L. (2001). "A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension." *J Cardiovasc Pharmacol* **38 Suppl 2**: S3-6.

SCHMIDT, A. e HALL, A. (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." *Genes Dev* **16**(13): 1587-1609.

SCHUPP, N., KOLKHOF, P., QUEISSER, N., GARTNER, S., SCHMID, U., KRETSCHMER, A., HARTMANN, E., OLI, R. G., SCHAFER, S. e STOPPER, H. (2011). "Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats." *FASEB J* **25**(3): 968-978.

SEARLS, Y. M., LOGANATHAN, R., SMIRNOVA, I. V. e STEHNO-BITTEL, L. (2010). "Intracellular Ca<sup>2+</sup> regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia." *Cardiovasc Diabetol* **9**: 8.

SEASHOLTZ, T. M., WESSEL, J., RAO, F., RANA, B. K., KHANDRIKA, S., KENNEDY, B. P., LILLIE, E. O., ZIEGLER, M. G., SMITH, D. W., SCHORK, N. J., BROWN, J. H. e O'CONNOR, D. T. (2006). "Rho kinase polymorphism influences blood pressure and systemic vascular resistance in human twins: role of heredity." *Hypertension* **47**(5): 937-947.

SEKO, T., ITO, M., KUREISHI, Y., OKAMOTO, R., MORIKI, N., ONISHI, K., ISAKA, N., HARTSHORNE, D. J. e NAKANO, T. (2003). "Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle." *Circ Res* **92**(4): 411-418.

SHIMOKAWA, H. e TAKESHITA, A. (2005). "Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(9): 1767-1775.

SIRAGY, H. M. (2009). "The potential role of the angiotensin subtype 2 receptor in cardiovascular protection." *Curr Hypertens Rep* **11**(4): 260-262.

SIRAGY, H. M., SENBONMATSU, T., ICHIKI, T., INAGAMI, T. e CAREY, R. M. (1999). "Increased renal vasodilator prostanoids prevent hypertension in mice lacking the angiotensin subtype-2 receptor." *J Clin Invest* **104**(2): 181-188.

SMITH, L., PAYNE, J. A., SEDEEK, M. H., GRANGER, J. P. e KHALIL, R. A. (2003). "Endothelin-induced increases in Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of vascular contraction are enhanced during high-salt diet." *Hypertension* **41**(3 Pt 2): 787-793.

SOFOLA, O. A., KNILL, A., HAINSWORTH, R. e DRINKHILL, M. (2002). "Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet." *J Physiol* **543**(Pt 1): 255-260.

SOMLYO, A. P. e SOMLYO, A. V. (2000). "Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II." *J Physiol* **522 Pt 2**: 177-185.

SOMLYO, A. P. e SOMLYO, A. V. (2003). "Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." *Physiol Rev* **83**(4): 1325-1358.

STREHLOW, K., NICKENIG, G., ROELING, J., WASSMANN, S., ZOLK, O., KNORR, A. e BOHM, M. (1999). "AT(1) receptor regulation in salt-sensitive hypertension." *Am J Physiol* **277**(5 Pt 2): H1701-1707.

SUGIYAMA, T., YOSHIZUMI, M., TAKAKU, F. e YAZAKI, Y. (1990). "Abnormal calcium handling in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens* **8**(4): 369-375.

SYLVESTER, F. A., STEPP, D. W., FRISBEE, J. C. e LOMBARD, J. H. (2002). "High-salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(1): H353-363.

TADA, M., KIRCHBERGER, M. A. e KATZ, A. M. (1975). "Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **250**(7): 2640-2647.

TAKEDA, Y., ZHU, A., YONEDA, T., USUKURA, M., TAKATA, H. e YAMAGISHI, M. (2007). "Effects of aldosterone and angiotensin II receptor blockade on cardiac angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme 2 expression in Dahl salt-sensitive hypertensive rats." *Am J Hypertens* **20**(10): 1119-1124.

TANSEY, M. G., WORD, R. A., HIDAKA, H., SINGER, H. A., SCHWORER, C. M., KAMM, K. E. e STULL, J. T. (1992). "Phosphorylation of myosin light chain kinase by the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle cells." *J Biol Chem* **267**(18): 12511-12516.

TOMASCHITZ, A., PILZ, S., RITZ, E., OBERMAYER-PIETSCH, B. e PIEBER, T. R. (2010). "Aldosterone and arterial hypertension." *Nat Rev Endocrinol* **6**(2): 83-93.

TOUYZ, R. M. (2005). "Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology." *Antioxid Redox Signal* **7**(9-10): 1302-1314.

TOUYZ, R. M., DENG, L. Y., HE, G., WU, X. H. e SCHIFFRIN, E. L. (1999). "Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases." *J Hypertens* **17**(7): 907-916.

TOYODA, Y., SHIMA, H., SASAJIMA, H. e NISHIO, I. (1995). "Increased calcium sequestration by sarcoplasmic reticulum in small muscular arteries in young spontaneously hypertensive rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **22**(1): S223-224.

TWARDOWSKI, Z. J. (2008). "Sodium, hypertension, and an explanation of the "lag phenomenon" in hemodialysis patients." *Hemodial Int* **12**(4): 412-425.

UEHATA, M., ISHIZAKI, T., SATOH, H., ONO, T., KAWAHARA, T., MORISHITA, T., TAMAKAWA, H., YAMAGAMI, K., INUI, J., MAEKAWA, M. e NARUMIYA, S. (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." *Nature* **389**(6654): 990-994.

VAN ESCH, J. H., SCHUIJT, M. P., SAYED, J., CHOUDHRY, Y., WALTHER, T. e JAN DANSER, A. H. (2006). "AT2 receptor-mediated vasodilation in the mouse heart depends on AT1A receptor activation." *Br J Pharmacol* **148**(4): 452-458.

VANHOUTTE, P. M. e KATUSIC, Z. S. (1988). "Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion?" *Trends Pharmacol Sci* **9**(7): 229-230.

VARAGIC, J., FROHLICH, E. D., SUSIC, D., AHN, J., MATAVELLI, L., LOPEZ, B. e DIEZ, J. (2008). "AT1 receptor antagonism attenuates target organ effects of salt excess in SHR without affecting pressure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(2): H853-858.

VELTMAR, A., GOHLKE, P. e UNGER, T. (1991). "From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect." *Am J Hypertens* **4**(3 Pt 2): 263S-269S.

WANG, H., ETO, M., STEERS, W. D., SOMLYO, A. P. e SOMLYO, A. V. (2002). "RhoA-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in erectile function." *J Biol Chem* **277**(34): 30614-30621.

WANG, Y., WANG, W., WANG, Q., WU, J., XU, J. e WU, X. (2007). "[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and PKC- $\alpha$  are involved in the inhibitory effects of Ib, a novel nonpeptide AngiotensinII subtype AT1 receptor antagonist, on AngiotensinII-induced vascular contraction in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **364**(1): 118-123.

WATRAS, J. e BENEVOLENSKY, D. (1987). "Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release from canine aortic sarcoplasmic reticulum vesicles." *Biochim Biophys Acta* **931**(3): 354-363.

WEBB, R. C. (2003). "Smooth muscle contraction and relaxation." *Adv Physiol Educ* **27**(1-4): 201-206.

WEBER, D. S. e LOMBARD, J. H. (2000). "Elevated salt intake impairs dilation of rat skeletal muscle resistance arteries via ANG II suppression." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(2): H500-506.

WEBER, D. S. e WEBB, R. C. (2001). "Enhanced relaxation to the rho-kinase inhibitor Y-27632 in mesenteric arteries from mineralocorticoid hypertensive rats." *Pharmacology* **63**(3): 129-133.

WEHRWEIN, E. A., NORTHCOTT, C. A., LOBERG, R. D. e WATTS, S. W. (2004). "Rho/Rho kinase and phosphoinositide 3-kinase are parallel pathways in the development of spontaneous arterial tone in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension." *J Pharmacol Exp Ther* **309**(3): 1011-1019.

WEINBERGER, M. H., MILLER, J. Z., LUFT, F. C., GRIM, C. E. e FINEBERG, N. S. (1986). "Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance." *Hypertension* **8**(6 Pt 2): II127-134.

WESTON, A. H., PORTER, E. L., HARNO, E. e EDWARDS, G. (2010). "Impairment of endothelial SK(Ca) channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats." *Br J Pharmacol* **160**(4): 836-843.

WHO (2011). *Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control*: 2-6.

WIBBERLEY, A., CHEN, Z., HU, E., HIEBLE, J. P. e WESTFALL, T. D. (2003). "Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle." *Br J Pharmacol* **138**(5): 757-766.

WIER, W. G. e MORGAN, K. G. (2003). "Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **150**: 91-139.

WILLIAMS, B. (2009). "The year in hypertension." *J Am Coll Cardiol* **55**(1): 65-73.

WILSON, D. P., SUSNJAR, M., KISS, E., SUTHERLAND, C. e WALSH, M. P. (2005). "Thromboxane A2-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697." *Biochem J* **389**(Pt 3): 763-774.

WIRTH, A. (2010). "Rho kinase and hypertension." *Biochim Biophys Acta* **1802**(12): 1276-1284.

WOLFRUM, S., DENDORFER, A., RIKITAKE, Y., STALKER, T. J., GONG, Y., SCALIA, R., DOMINIAK, P. e LIAO, J. K. (2004). "Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(10): 1842-1847.

XIAO, F., PUDDEFOOT, J. R., BARKER, S. e VINSON, G. P. (2004). "Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation." *Hypertension* **44**(3): 340-345.

YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. e MASAKI, T. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* **332**(6163): 411-415.

YU, H. C., BURRELL, L. M., BLACK, M. J., WU, L. L., DILLEY, R. J., COOPER, M. E. e JOHNSTON, C. I. (1998). "Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats." *Circulation* **98**(23): 2621-2628.

YUSUF, S., REDDY, S., OUNPUU, S. e ANAND, S. (2001). "Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific

ethnic groups and geographic regions and prevention strategies." *Circulation* **104**(23): 2855-2864.

ZEMANCIKOVA, A. e TOROK, J. (2009). "Effect of chronic nifedipine treatment on blood pressure and adrenergic responses of isolated mesenteric artery in young rats with developing spontaneous hypertension." *Physiol Res* **58**(6): 921-925.

ZHAI, P., YAMAMOTO, M., GALEOTTI, J., LIU, J., MASUREKAR, M., THAISZ, J., IRIE, K., HOLLE, E., YU, X., KUPERSHMIDT, S., RODEN, D. M., WAGNER, T., YATANI, A., VATNER, D. E., VATNER, S. F. e SADOSHIMA, J. (2005). "Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice." *J Clin Invest* **115**(11): 3045-3056.

ZHAO, X., WHITE, R., HUANG, B. S., VAN HUYSSSE, J. e LEENEN, F. H. (2001). "High salt intake and the brain renin--angiotensin system in Dahl salt-sensitive rats." *J Hypertens* **19**(1): 89-98.

ZHU, J., HUANG, T. e LOMBARD, J. H. (2007). "Effect of high-salt diet on vascular relaxation and oxidative stress in mesenteric resistance arteries." *J Vasc Res* **44**(5): 382-390.